



Impact d'un stress viral sur la transcription des SINE d'*Arabidopsis thaliana* et influence de l'ARN SINE sur la kinase GCN2

Sébastien Lageix

► To cite this version:

Sébastien Lageix. Impact d'un stress viral sur la transcription des SINE d'*Arabidopsis thaliana* et influence de l'ARN SINE sur la kinase GCN2. Génétique des populations [q-bio.PE]. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2008. Français. NNT : 2008CLF21872 . tel-00731032

HAL Id: tel-00731032

<https://theses.hal.science/tel-00731032>

Submitted on 11 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
Numéro d'ordre : E.D. 487

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires)

Soutenue le 7 novembre 2008

Sébastien Lageix

**Impact d'un stress viral sur la transcription des SINE
d'*Arabidopsis thaliana* et influence de l'ARN
SINE sur la kinase GCN2.**

Président : Pr. Georges Picard, Université Blaise Pascal, Aubière

Rapporteurs : Dr. Christian Meyer, INRA, Versailles
Dr. Lyubov Ryabova, IBMP, Strasbourg

Membres : Dr. Josep M. Casacuberta, CRAG, Barcelone
Pr. Jean-Marc Deragon, Université de Perpignan
Dr. Thierry Pélissier, Université de Perpignan
Pr. Christophe Robaglia, LGBP, Marseille

U.M.R. C.N.R.S. 6247-GReD
24, avenue des Landais 63177 Aubière Cedex

Je remercie les rapporteurs de cette thèse, Christian Meyer et Lyubov Ryabova pour la rapidité avec laquelle ils ont lu mon manuscrit et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également aux autres membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : Josep Casacuberta, Christophe Robaglia et en particulier Georges Picard, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Merci à Jean-marc, mon directeur de thèse, pour tes conseils et ta confiance. Surtout merci de ne jamais avoir râlé pour toutes ces commandes incessantes et exorbitantes d'anticorps !

Merci à Thierry, mon chef, merci pour ton aide et tes conseils durant toutes ces années, je ne sais pas si j'ai été un bon étudiant, mais tu as été un chef exemplaire. Pendant toute ma thèse tu m'as souvent menacé de coups de pied dans le derrière, je te remercie donc de n'avoir jamais réalisé cette menace !

Un grand merci à Marie-Noëlle, sans qui ma relation avec Thierry aurait été bien différente. Merci pour tous ces instants passés à débattre science et techniques, à discuter des dernières publiés sorties. Du moins c'est ce que certaines personnes ont dû s'imaginer ! J'espère que ces conversations hautement intéressantes à portée philosophique continueront, je crois qu'on est loin d'en avoir fait le tour !

J'aimerais spécialement présenter ma reconnaissance infinie à Marie-claude pour son immense générosité, sa chaleureuse hospitalité au sein du labo 4, son humour communicatif, ses pertinentes remarques et sa dynamique énergie. Marie-claude, j'attends toujours que tu touches le pactole au casino pour partir à l'autre bout du monde avec toi...

Un grand merci à Sophie qui m'a pris sous son aile dès mon arrivée en DEA. Je ne te remercie pas pour les tiques de langage et les courses de vitesse à la gare. Par contre, je te remercie pour ton aide, ta gentillesse et pour la fameuse technique de l'imposition des mains. Sans toi je n'aurais jamais appris à courir les bras levés dans le couloir comme toute bécasse digne de ce nom sait le faire.

Merci aussi à tous les autres membres de l'équipe, présent ou partis : Cécile, Hien, Alain et Carles.

A Chantal et Maryse, avec qui un jour j'espère je pourrai réaliser notre projet de buron perdu dans la montagne.

Merci aussi à Claudine, Sylvie et Sylviane pour tous ces petits repas partagés en salle café. Merci pour leur gentillesse.

Julien : je ne sais pas comment te remercier sans utiliser un certain nombre de mots dont la décence m'interdit d'utiliser ici. Merci de m'avoir appris à taper dans les mains quand il faut, merci de m'avoir fait rire quand je n'en avais pas envie et merci pour les calesan sesnares. Proud not to be minimal.

Un très grand merci à Punkie, pour tous ces moments où l'on ne pensait pas y arriver. Tu vois c'est fait ! Merci d'avoir accepté de souffler avec moi, merci pour les propositions de suicides collectifs et merci de n'être pas plus organisée que moi. Bosse bien la pâtisserie et la fabrication de tartes, on en aura peut-être besoin dans pas longtemps...

Merci à Elodie, pour sa fraîcheur et sa spontanéité. Tu as été mon rayon de soleil pendant ses derniers mois, je ne sais comment te remercier. Je ne t'oublierais pas. (Merci surtout d'avoir écrit toi-même ces quelques lignes te concernant... NB : je le pense également).

Enfin, une pensée émue pour tous les étudiants avec qui j'ai partagé une salle, un thé ou un repas pendant ces quelques années : Jean-Yves, Guillaume, Sandra, Olivier, Jean-Baptiste (merci de m'avoir fait garder Lola et pas Camille !) et Cyril et toute la troupe du feu très convivial Laboratoire Biomove ; compagnons de fortune (ou d'infortune), on ne se rend pas toujours compte à quel point ils peuvent être importants dans le travail et dans la vie, jusqu'au jour où nos chemins se séparent.

Un merci tout particulier à Isabelle pour ses petits instants autour d'un café qui a toujours été d'une grande aide et de bons conseils.

Double remerciement à Géraldine pour cette amitié de 10 ans. Merci pour la Durée, le court-métrage, les restos et les blagues pas toujours de première fraîcheur. Merci de ne jamais m'avoir laissé un moment de répit. Je tiendrais ma promesse pour l'histoire du drain, c'est juré.

Merci à Sophie pour les cinés, toutes ces soirées à la coopé et au Hand Clapping Girls, ta connaissance en matière de musique m'étonnera toujours. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Merci à la personne qui m'a le plus aidé au cours de la rédaction de cette thèse, mon chat, Hermine, qui, assise sur mes genoux en ronronnant, m'a souvent évité de nombreuses crises de nerfs.

Je ne pourrais jamais oublier le soutien et l'aide des personnes chères de ma nombreuse et merveilleuse famille. Merci à mes parents, ma sœur et mon frère.

ABBREVIATIONS

A : Adénine
ACC : Acide 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylique
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN Complémentaire
AgT : Antigène grand T
Ala : Alanine
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN Messenger
ARNr : ARN ribosomiques
ARNt : ARN de transfert
ATF4 : Activating Transcription Factor 4
ATP : adénosine triphosphorique
Aza : Aza-adénine
bZIP : basic leucine Zipper
C: Cytosine
CBP : Calmodulin Binding Protein
CdCl₂: Chlorure de cadmium
CDK : Cyclin Dependant Kinase
Chlor : Chlorsulfuron
CLINK : Cell-cycle link
CTD : Domaine Carboxy-Terminal
CYC : Cycline
DEX : Dexaméthasone
DMT : ADN Méthyl Transférase
DP : Dimerization Partner
DRBD : Double-stranded RNA-Binding Domain
E2F : Adenovirus E2 promoter binding Factor
EDTA : Adenovirus E2 promoter binding Factor
eIF2 α : eukaryotic Initiation Factor 2 alpha
ETT : ETTIN
FBNYV : Faba bean necrotic yellows virus
G : Guanine
G1 : Gap1
G2 : Gap2
GCN2 : General Control Non-derepressible-2
GCN4 : General Control Non-derepressible-4
GDP : Guanosine diphosphate
Gly : Glycine
GTP : Guanosine Triphosphate
HDAC : Histones déacétylase
HisRS : Histine tRNA Synthase
HMT : Histone Méthyl Transférases

HPV : Human papillomavirus
HRI : Heme-Regulated Inhibitor
HSP : Heat Shock Protein
HU : hydroxyurée
IgG : Immunoglobulines de type G
LINE : Long Interspersed Nuclear Element
LTR : Long Terminal Repeat
Lys : Lysine
MIF : Mitosis Inducing Factor
MMS : méthyl méthane sulfonate
MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MP : MONOPTEROS
MSH : mismatch repair homologue of MutS family
NLS : domaines de localisation nucléaire
ORC : Origin recognition complex
PCR : Polymerase Chain Reaction
PERK : Pancreatic ER Kinase ou PKR-like ER Kinase
PKR : RNA-activated protein kinase
Pol I : ARN polymérase I
Pol II : ARN polymérase II
Pol III : ARN polymérase III
PP1 : Protéine Phosphatase 1
RB : Rétinoblastome
RE : Réticulum Endoplasmique
Rep : Réplicase
RNAi : ARN interference
RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR
RWD : RING finger DEAD-like
SINE : Short Interspersed Nuclear Element
siRNA : Small Interfering RNA
SV40 : Simian Virus 40
SWI/SNF : SWITCH [SWI]/SUCROSE NON-FERMENTING [SNF]
T : Thymine
TAF : TBP associated factors
TAP : Tandem Affinity Purification
tasiRNA : trans-acting siRNA
TBP : TATA-Binding Protein
TEV : Tobacco Etch Virus
TFIIIC : Transcription factors IIIC
TOR : Target Of Rapamycin
UBF : Upstream Binding Factor
uORF : upstream open reading frame
UPR : Unfolded Protein Response
UTR : UnTranslated Region
UV : Ultra Violet
Val : Valine

SOMMAIRE

Synthèse bibliographique	1
 <u>Partie I: Les éléments transposables</u>	2
I. Introduction.....	3
II. Les SINE : généralités.	4
III. Structure des éléments SINE.....	4
IV. Mobilité des éléments SINE.	5
V. L'expression des SINE et son contrôle.	7
V.1. La transcription des SINE.	7
V.2. Le contrôle de la transcription.....	8
V.3. Régulation post-transcriptionnelle	8
VI. Les familles de SINE de Brassicaceae.....	9
VII. Impact cellulaire des SINE.	10
VII.1. Impact génomique.	10
VII.2. Activation des SINE au cours d'un stress.....	10
VII.3. Rôle riborégulateur des SINE.....	11
VII.3.1) Le contrôle de la transcription via l'ARN polymérase II.	11
VII.3.2) Le contrôle de la traduction via la kinase PKR.	11
VII.3.3) La fonction riborégulatrice des SINE chez la plante.....	12
 <u>Partie II: Rétinoblastome: le lien entre le cycle cellulaire et la croissance</u>	14
I. Généralités.	15
II. Le cycle cellulaire.....	16
II.1. Généralités.....	16
II.2. Le cycle cellulaire chez les plantes.....	17
III. Les caractéristiques de la protéine RB.	18
III.1. Le domaine amino-terminal (N terminal).	18
III.2. Le petit domaine « pocket ».	19

III.3. Le domaine Carboxy-terminal (C terminal).....	20
IV. Contrôle de RB par la phosphorylation.....	21
IV.1. Phosphorylation de RB au cours du cycle cellulaire chez les mammifères.....	22
IV.1.1) Phosphorylation de RB via la voie cyclin D/CDK4 et CDK6.....	22
IV.1.2) Phosphorylation de RB via la voie cyclin E/CDK2.....	22
IV.1.3) Phosphorylation de RB au cours du cycle cellulaire.	23
IV.1.4) Rôle des complexes Cycline A/CDK2 et Cycline A/CDC2 dans la phosphorylation de RB.....	23
IV.2. La phosphorylation de RB chez la plante au cours du cycle cellulaire.....	24
V. Déphosphorylation de la protéine RB au cours du cycle cellulaire.	25
VI. Les protéines de la famille RB.....	26
VII. Les facteurs E2F.	27
VII.1. Chez les mammifères.....	27
VII.1.1) Les facteurs E2F1, E2F2 et E2F3a.....	28
VII.1.2) Les facteurs E2F3b, E2F4 et E2F5.....	28
VII.1.3) Les facteurs E2F6, E2F7 et E2F8.....	28
VII.2. Chez les plantes.	29
VIII. Les facteurs DP	30
IX. Les gènes contrôlés par les facteurs E2F.	31
IX.1. Les gènes identifiés chez les mammifères.	31
IX.2. Les gènes identifiés chez les plantes.....	32
X. Contrôle des facteurs E2F par la protéine RB au cours du cycle cellulaire.	33
X.1. Chez les mammifères.	33
X.2. Contrôle des facteurs E2F par RB chez les plantes.....	35
XI. Rôle de RB dans le contrôle de la croissance cellulaire	37
XI.1. Contrôle de l'activité de l'ARN polymérase I.	37
XI.2. Contrôle de l'activité de l'ARN polymérase III.....	38
XII. L'impact des virus sur le cycle cellulaire via le contrôle de la fonction RB.....	40
XII.1. Les protéines virales à domaine LxCxE.	40
XII.1.1) Le cas des virus HPV, SV40 et adénovirus.....	40
XII.1.2) L'impact des protéines virales sur le cycle cellulaire.....	42
XII.2. Les virus ADN de plantes.....	42

XII.2.1) Le cas des géminivirus.	43
XII.2.2) Un exemple de nanovirus : le Faba Bean Necrotic Yellow Virus.....	44
<u>Partie III: Les kinases d'eIF2 alpha et le contrôle de la traduction</u>	45
I. Généralités.	46
II. Les kinases d'eIF2 alpha.	46
II.1. GCN2.....	46
II.1.1) Structure de la protéine.	46
II.1.2) Activation de GCN2.....	50
a. A la suite d'une carence en acides aminés.....	50
b. Carence en purine.	51
c. Carence en glucose.	52
d. Stress salin.	53
e. Impact de l'agent alkylant méthyl méthane sulfonate et de l' hydroxy-urée.	54
f. Contrôle de GCN2 par les UV.	54
g. Le stress oxydatif.....	55
h. Les anesthésiques.	56
II.1.3) Le contrôle de GCN2 par des protéines chaperones.	56
II.2. Les autres kinases d'eIF2 α	57
II.2.1) Chez les mammifères.	57
a. HRI.....	57
b. La PERK.....	58
c. PKR.....	60
II.2.2) La situation chez Schizosaccharomyces pombe.....	62
II.2.3) La situation chez les invertébrés.	62
II.3. Phosphorylation d'eIF2 alpha.....	63
II.4. Déphosphorylation d'eIF2 α	64
II.5. La voie TOR et le contrôle de la phosphorylation d'eIF2 α chez la levure.....	64
II.5.1) La voie TOR et le contrôle de la traduction.	64

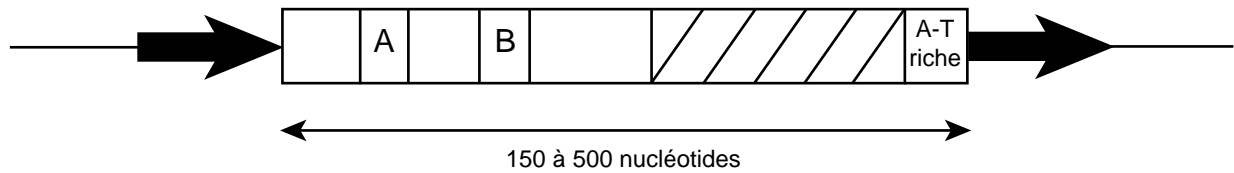
II.5.2) Cross-talk entre la voie GCN2/eIF2 α et la voie TOR	65
II.6. L'initiation de la traduction chez les eucaryotes et son contrôle par eIF2 α	66
II.7. La phosphorylation d'eIF2 α conduit à l'augmentation spécifique de la traduction de certains facteurs de transcription.....	67
II.7.1) Chez la levure.....	67
a. GCN4.....	67
b. Les gènes cibles de GCN4.....	68
II.7.2) Chez les mammifères.	69
a. Le facteur de transcription ATF4.....	69
b. Les gènes cibles d'ATF4.	70
III. Conservation de la voie eIF2 α /traduction dans le monde végétal.....	71
III.1. Phosphorylation d'eIF2 α et initiation de la traduction chez les plantes.....	71
III.2. La kinase GCN2 chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
III.3. Existence d'une activité PKR chez les plantes.....	72
III.4. La voie TOR chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
III.5. Contrôle des gènes intervenant dans la biosynthèse des acides aminés.....	73
III.6. Les facteurs bZIP chez les plantes.	74
Objectifs des travaux de thèse.....	75
Résultats.....	78
I. Impact du stress viral sur la fonction RB chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
I.1. Article 1 : The nanovirus-encoded CLINK protein affects plant cell cycle regulation through interaction with the retinoblastoma-related protein.	79
I.2. Données supplémentaires.....	91
I.2.1) Impact de l'infection virale sur la transcription pol III.	91
a. Crible des plantes infectées par le virus FBNYV.	91
b. Quantification de l'expression de gènes pol III chez les plantes infectées.	92

c. Impact de l'infection virale sur la transcription de l'élément SINE SB1 dans un contexte hétérologue.	93
d. Impact sur l'expression des loci SINE d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	94
I.2.2) Impact de l'expression de la protéine CLINK sur la transcription.	95
a. Induction de l'expression de CLINK ou CLINK mutant.	96
b. Quantification de l'expression des gènes pol III et pol I par Northern blot.	96
c. Détection des transcrits SINE endogène par RT-PCR.	97
II. Caractérisation de la protéine GCN2 chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	97
II.1. Article 2 : <i>Arabidopsis</i> eIF2 α kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding.	97
II.2. Données supplémentaires.	127
II.2.1) Impact du cadmium sur la voie de contrôle de la traduction par eIF2 α	127
II.2.2) Purification de GCN2 par la méthode du TAP tag et analyse de ses partenaires.	128
II.2.3) Impact de la surexpression d'un élément SINE sur l'activité kinase de GCN2..	130
II.2.4) Impact de la phosphorylation d'eIF2 α sur la réinitiation de la traduction.	131
II.2.5) Etude de la conservation de la voie de réponse générale des gènes de biosynthèse en réponse à la phosphorylation d'eIF2 α	132
II.2.6) Recherche d'éventuels gènes cibles de facteurs bZIP contrôlés par la phosphorylation d'eIF2 α	134
Discussion	136
I. Régulation de la transcription des éléments SINE.....	137
I.1. Impact du stress viral et de la protéine CLINK sur la transcription pol III.	137
I.1.1) Impact du stress viral sur l'expression des SINE.	139
I.1.2) La protéine CLINK et la fonction de RB dans la cellule végétale.	140
II. Le rôle des SINE dans la physiologie de la cellule végétale.	142
II.1. Il n'existe qu'une seule kinase d'eIF2 α dans le monde végétale : GCN2.....	143
II.2. Régulation de l'activité de GCN2 chez les plantes.	143

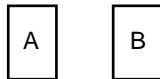
II.3. La phosphorylation d'eIF2 α et la traduction des uORF chez la plante.	147
II.4. Recherche d'un homologue de GCN4 dans le monde végétal.	148
II.5. Conservation de la régulation générale des gènes de biosynthèse des acides aminés.	148
II.6. Impact des éléments SINE sur l'activité de GCN2.	149
Matériels et méthodes	151
I. Matériel végétal.	152
I.1. Plantes gcn2 mutantes.....	152
I.2. Construction des plantes gcn2 mut x GCN2 et gcn2 mut x GCN2-TAP.....	152
I.2.1) Les plantes C3H18.	153
I.2.2) Plantes infectées par le virus FBNYV (Faba Bean Necrotic Yellow Virus).....	153
I.2.3) Plantes transgéniques CLINK et conditions d'induction.	153
II. Conditions de stress utilisées.	154
III. Extraction d'ADN génomique	155
IV. PCR.....	155
V. Extraction d'ARN totaux	155
VI. Hybridation northern.....	156
VI.1. Détection d'ARN en gel Mops-agarose.....	156
VI.2. Détection d'ARN de bas poids moléculaire en gel polyacrylamide (PAA)	156
VII. RT-PCR des éléments SINE endogènes	157
VIII. Western blot.	157
IX. Préparation et transformation transitoire de protoplastes d' <i>Arabidopsis</i>	157
X. TEST LUCIFERASE	158
XI. PURIFICATION TAP TAG	159
Références bibliographiques	161
Annexes	195

Synthèse bibliographique

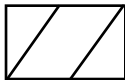
Partie I : Les éléments transposables.



: répétitions directes de la séquence cible pouvant varier de quelques nucléotides à une vingtaine de nucléotides.



: séquences conservées de la région promotrice répondant à l'ARN polymérase III.



: région plus ou moins importante d'origine inconnue.

A-T
riche

: région de taille variable selon l'élément (quelques dizaines de nucléotides) située à l'extrémité 3', constituée d'une queue poly (A) pure ou d'une séquence riche en résidus adénine et thymine arrangées en motifs plus ou moins complexes..

Figure 1: Structure canonique des éléments SINE monomériques.

I. Introduction.

Les séquences répétées et notamment les éléments transposables composent une part importante des génomes et peuvent représenter près de 80% du génome de certaines plantes. Ils jouent un rôle majeur dans l'évolution de la structure des génomes et dans la création de diversité génétique. Des éléments transposables ont été mis en évidence dans tous les génomes des espèces où on les a recherchés, depuis les bactéries jusqu'aux mammifères, en passant par la levure, les végétaux, les insectes, les nématodes. Depuis que l'on possède les séquences génomiques complètes de plusieurs espèces on se rend compte que les séquences mobiles constituent une fraction importante des génomes : 17% du génome de *Arabidopsis thaliana*, 18% du génome de *Drosophila melanogaster*, 42% du génome de *Homo sapiens* et plus de 50% du génome de *Zea mays* (The Arabidopsis Genome Initiative 2000; The genome sequence of *Drosophila melanogaster* 2000; Initial sequencing and analysis of the human genome 2001; Dong *et al.* 2003).

Les éléments transposables sont des séquences d'ADN capables de se déplacer au sein du génome selon un processus de type répliatif ou non-répliatif. On classe généralement les éléments transposables en deux catégories : les éléments de classe I et de classe II (Prak and Kazazian 2000; Wicker *et al.*, 2007).

Les éléments de classe I sont constitués des rétrotransposons à LTR (Long Terminal Repeat), et les rétroéléments sans LTR : les LINE (Long INterspersed Element) et les SINE (Short INterspersed Element). Ils sont transcrits en ARN et ils créent de nouvelles copies par transcription inverse de cet intermédiaire ARN. Il s'agit donc d'un processus de type répliatif car une nouvelle copie est créée alors que l'élément d'origine reste en place.

Les éléments de classe II, appelés transposons, créent de nouvelles copies directement par excision et insertion de leur séquence ADN à un nouveau site chromosomique en utilisant un intermédiaire ADN selon un mode répliatif ou non-répliatif.

Dans les deux classes, il existe des éléments autonomes et des éléments non-autonomes. Les éléments autonomes codent les protéines nécessaires à leur propagation. Les éléments non-autonomes ne codent pas les enzymes nécessaires à leur transposition. En revanche, ils partagent une partie des caractéristiques d'éléments autonomes ce qui leur permet de parasiter la machinerie produite par ces derniers.

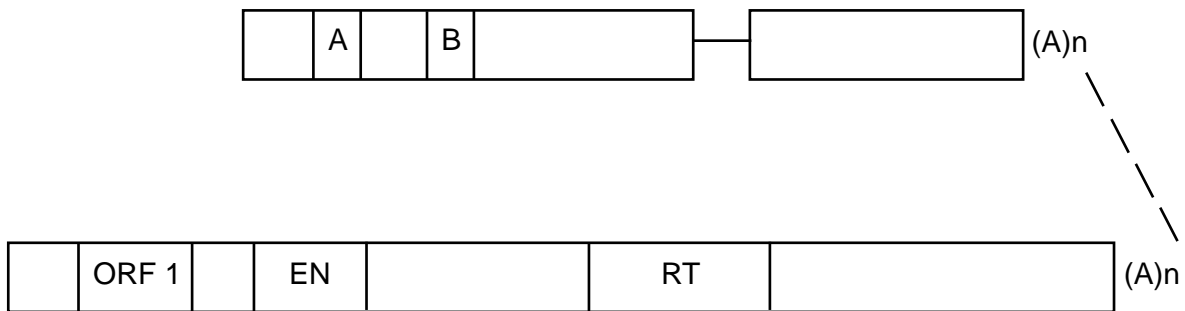
II. Les SINE : généralités.

Les éléments SINE ont été découverts il y a plus de 25 ans avec le clonage des éléments B1 et B2 de rongeur et de l'élément Alu de primate (Kramarov *et al.* 1979; Jelinek *et al.* 1980; Deininger *et al.* 1981). Ces éléments sont très représentés dans les génomes de mammifères, par exemple, il existe plus d'un million de copies du SINE Alu dans le génome humain, ce qui fait de lui l'élément transposable le plus abondant du génome, et aussi l'élément SINE le plus étudié. La présence d'éléments SINE a ensuite été mise en évidence au sein de nombreux génomes comme ceux des reptiles, des poissons, des tuniciers, des insectes et des plantes à fleurs (Endoh and Okada 1986; Kido *et al.* 1991; Simmen and Bird 2000; Bradfield *et al.* 1985; Mochizuki *et al.* 1992). En revanche, ils semblent absents des génomes des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* et des organelles. Les SINE sont des éléments non-autonomes et dépendent pour leur rétroposition de la machinerie des LINE. On ne connaît effectivement pas de génome qui contiendrait des SINE mais pas de LINE. En revanche les éléments SINE sont absents de certains génomes, comme celui de la drosophile où on trouve des LINE actifs (Kramarov and Vassetzky 2005).

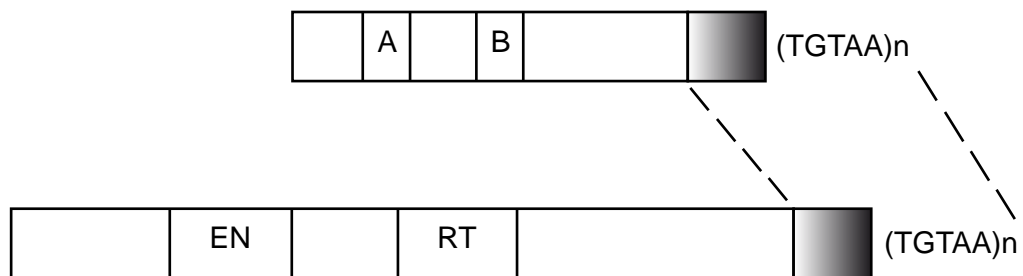
III. Structure des éléments SINE.

Les SINE sont des séquences courtes (150 à 500 paires de bases). Dans la majorité des cas, les éléments sont flanqués de courtes répétitions (habituellement de 5 à 15 paires de bases) en orientation directe générées par le processus de mobilité. La structure typique d'un élément SINE présente de trois parties : une région 5', une région interne et une queue poly (A) (Figure 1).

Les SINE possèdent dans la région 5' un promoteur interne constitué d'une boîte A et d'une boîte B séparées de 30 à 60 pb, une organisation typiquement reconnue par l'ARN polymérase III. Cette région 5' présente un certain niveau d'homologie avec les gènes dont elle dérive : soit les gènes d'ARNt, comme c'est le cas de la majorité des SINE (Daniels and Deininger 1985; Deragon *et al.* 1994; Ohshima and Okada 1994; Lenoir *et al.* 2001) soit avec le gène de l'ARN 7SL, comme c'est le cas pour l'élément Alu de primate B1 de rongeur (Ullu



Le couple Alu/L1: un exemple de la poly (A) connexion



Cas des couples SINE/LINE présentant des homologies de séquence.
(Le couple UnaSINE1 et UnaL2 de l'anguille est donné à titre d'exemple)

Figure 2: La relation SINE/LINE dans la rétroposition.

Les régions communes entre SINE et LINE, nécessaires à la reconnaissance par les protéines du LINE et à la rétroposition, sont indiquées

and Tschudi 1984), ou même avec le gène 5S pour l'élément SINE3 de poisson (Kapitonov and Jurka 2003).

Les éléments SINE peuvent ensuite posséder une région interne dite « corps ». Cette région n'est pas apparentée à l'ARN cellulaire dont le SINE dérive et sa séquence est propre à chaque famille de SINE.

Enfin, les SINE se terminent par une séquence appelée « queue 3' » composée de nucléotides A (queue poly(A)) ou de répétitions simples. Il faut noter qu'il existe des éléments ne correspondant pas exactement à ce schéma. Ainsi certains éléments ont des parties corps ou queue 3' très courtes, voire inexistantes, par exemple le SINE ID de rongeur n'a pas de partie corps. De même certains SINE, comme l'élément Alu et plusieurs familles de SINE de plantes, ont une forme dimérique.

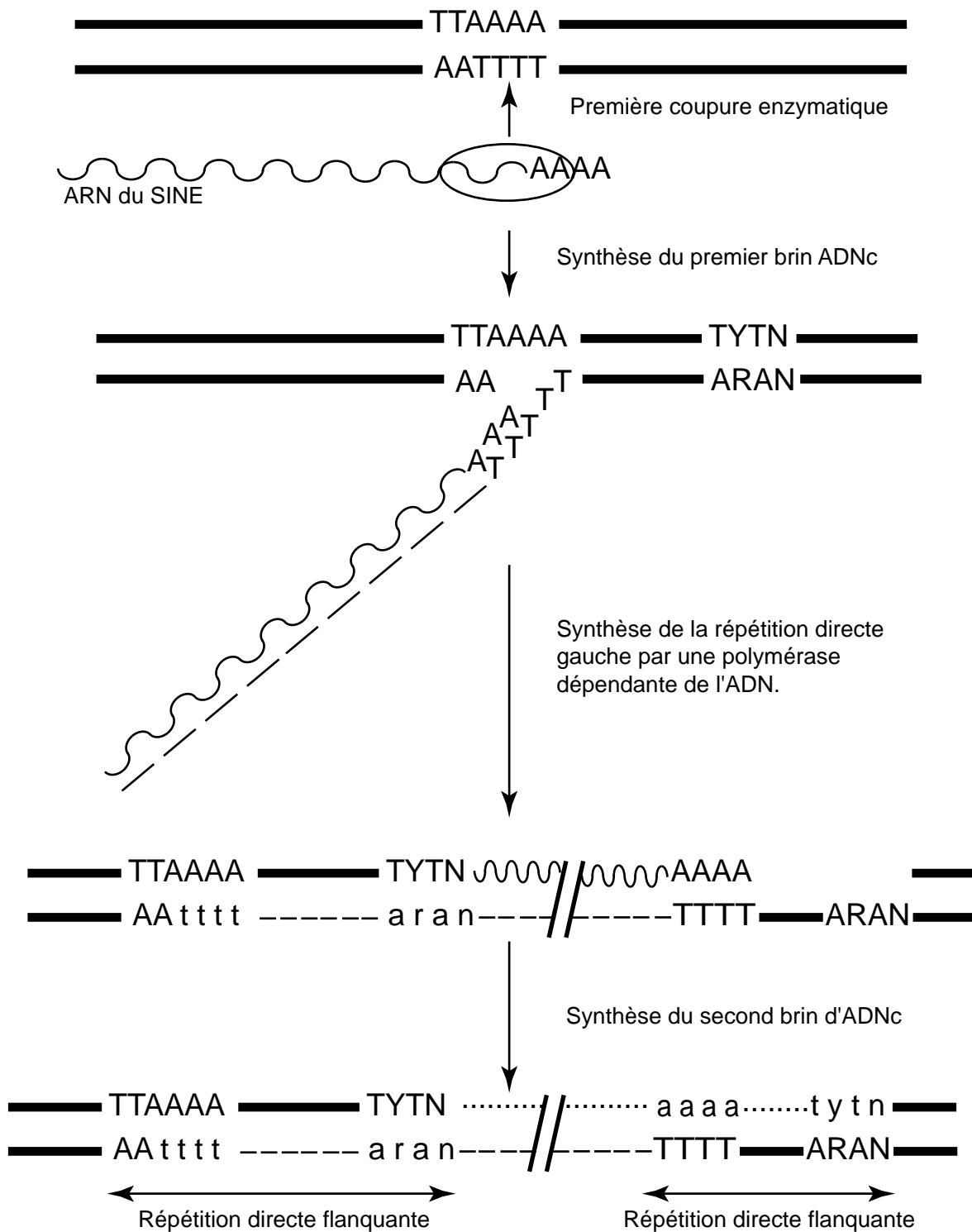
IV. Mobilité des éléments SINE.

De nombreux indices laissent penser que les SINE utilisent la machinerie enzymatique codée par les éléments LINE pour se multiplier. Ainsi, les séquences consensus d'intégration des éléments LINE et SINE dans les génomes sont similaires que ce soit chez les mammifères ou les plantes (Jurka 1997; Tatout *et al.* 1998). Cela suggère que l'endonuclease codée par les LINE est utilisée pour l'insertion des LINE mais aussi des SINE. La première preuve directe de cette relation SINE-LINE n'a été apportée que récemment. En utilisant un modèle permettant de suivre la transposition du SINE Alu humain, une étude a montré *ex vivo* que les protéines codées par le LINE L1 humain permettent la rétroposition de l'élément Alu (Dewannieux *et al.* 2003).

A ce jour, deux modèles ont été avancés pour la rétroposition des éléments SINE, basés sur une spécificité de reconnaissance différente du SINE par la machinerie des LINE (Figure 2).

-La « poly(A) connexion ».

C'est le modèle proposé pour les couples SINE/LINE qui ne possèdent pas d'homologie primaire de séquence (Esnault *et al.* 2000). Les protéines codées par l'élément LINE seraient capables d'interagir avec différents substrats ARN par simple reconnaissance d'une queue poly(A). Cette hypothèse permettrait d'expliquer la formation des pseudogènes



(D'après Jurka *et al*, 1997)

Figure 3: Modèle d'intégration des rétroposons Alu.

L'ARN du SINE est pris en charge par la machinerie de rétroposition du LINE L1: le site de clivage est reconnu par l'endonucléase du LINE puis l'ARN du SINE est reverse transcrit.
Le second brin du site est coupé et le second brin de l'ADNc synthétisé.

mais surtout de comprendre comment sont mobilisés les SINE. En effet, les transcrits des éléments SINE possédant une région poly(A) seraient reconnus par la machinerie de rétroposition des LINE *via* cette séquence poly(A), permettant ainsi leur mobilisation. C'est le cas typique du couple Alu/L1 chez l'homme décrit ci-dessus pour lequel la perte de la queue poly(A) d'Alu entraîne effectivement un arrêt des événements de rétroposition des éléments Alu médiés par les protéines du LINE (Dewannieux, Esnault and Heidmann 2003).

-Le partage d'homologie de séquence primaire.

Ce type de reconnaissance pourrait concerner l'ensemble des SINE ne possédant pas de queues poly(A) pures. Ces SINE présenteraient alors une région terminale d'homologie avec la région 3' UTR (Untranslated Terminal Region) et les répétitions terminales, plus ou moins complexes, d'éléments LINE présents dans le même génome. De nombreux couples potentiels SINE-LINE de ce type ont été décrits (Okada and Hamada 1997). Pour l'un d'entre eux identifié chez l'anguille, il a été montré que cette région 3' commune est essentielle à la reconnaissance de l'ARN par la machinerie du LINE, assurant ainsi la mobilisation spécifique de ces éléments LINE mais aussi celle des SINE (Kajikawa and Okada 2002).

Une fois le transcrit SINE reconnu par le complexe de rétroposition, la transcription inverse se ferait grâce à la transcriptase inverse codée par l'élément LINE au niveau du site d'intégration riche en résidus A/T. Ce site est clivé par l'endonucléase codée par le LINE et l'ARN, associé au site de coupure *via* des interactions avec sa région AT riche, est alors reverse transcrit. Enfin le second brin du site est coupé et le deuxième brin d'ADN est synthétisé. L'intégration du SINE est généralement associée à une duplication plus ou moins importante du site d'intégration (Figure 3).

Les SINE peuvent être présents en un grand nombre de copies dans les génomes eucaryotes. Cependant, il apparaît que seul un petit nombre de loci SINE peuvent être actifs d'un point de vue rétroposition. Ces SINE appelés « éléments fondateurs » possèdent un certain nombre de caractéristiques propres et doivent notamment être capables d'échapper, au moins dans certaines conditions, au contrôle négatif important exercé sur les éléments SINE par le génome hôte.

V. L'expression des SINE et son contrôle.

V.1. La transcription des SINE.

Les SINE sont transcrits par l'ARN polymérase III. L'initiation de la transcription résulte de la fixation du facteur de transcription TFIIC sur les boîtes A et B héritée de l'ARN cellulaire dont le SINE est dérivé qui permet le recrutement du facteur TFIIB. Le complexe TFIIC-TFIIB-ADN permet alors le recrutement de l'ARN polymérase III, son positionnement correct et l'initiation de la transcription au premier nucléotide de l'élément. Une fois initiée par la pol III, la transcription se poursuit sur la totalité de l'élément jusqu'à un signal de terminaison de transcription correspondant à une séquence d'au moins quatre résidus portant une base thymine (T) sur le brin transcrit (Bogenhagen and Brown 1981; Huang and Maraia 2001). Un tel signal n'est pas présent dans la séquence des éléments SINE, ce qui implique que leur transcription se poursuit dans l'ADN génomique flanquant, jusqu'à ce que la pol III rencontre une séquence faisant office de terminateur. Il en résulte que les transcrits primaires des SINE issus de différents loci sont hétérogènes en taille et en séquence en aval de la queue poly(A).

Malgré la présence d'un nombre très important d'éléments possédant un promoteur potentiellement autonome, il apparaît que le niveau de transcription spécifique de ces éléments est faible et lié à l'expression d'un nombre limité de copies (Paulson and Schmid 1986). Ainsi, même si chez l'homme l'ARN de l'élément Alu représente 10% des ARN pré-messagers, la majorité des transcrits détectés résulte d'événements de cotranscription dus à l'intégration d'éléments Alu à l'intérieur de séquences transcrites par l'ARN polymérase II (Kramerov *et al.* 1982; Deragon *et al.* 1996).

Les génomes eucaryotes comptent un grand nombre d'insertions SINE, mais seules quelques copies sont impliquées dans le phénomène d'amplification d'un élément. Ces copies, appelées gènes maîtres ou loci fondateurs réunissent des caractéristiques importantes pour l'activité de l'élément en termes de transcription mais aussi pour le processus de transcription inverse. Ainsi la région en amont de l'insertion doit contenir des séquences amplifiant la transcription de l'élément, lui permettant ainsi d'échapper, même partiellement, à la répression de la transcription et notamment dans les cellules de la lignée germinale (Chesnokov and Schmid 1996; Arnaud *et al.* 2001). De même, la région en aval de l'insertion

est impliquée dans la stabilité du transcrit mais aussi dans la capacité de l'ARN à initier la transcription inverse (Aleman *et al.* 2000; Pelissier *et al.* 2004). Chaque locus fondateur donnerait ainsi naissance à un nombre important de copies inactives.

V.2. Le contrôle de la transcription.

La régulation transcriptionnelle des SINE est complexe et passe notamment par la fixation de différents facteurs activateurs et répresseurs, la formation d'une structure chromatinienne répressive et la méthylation de l'ADN. Ainsi, il a pu être montré que les SINE S1 du colza et les SINE d'*Arabidopsis thaliana* s'intègrent surtout dans des régions hypométhylées du génome mais qu'ils sont ensuite fortement et spécifiquement méthylés (Arnaud *et al.* 2000). Cette méthylation inhibe la transcription des éléments S1 *in vitro* et est certainement un composant important de cette inactivation *in vivo* (Arnaud *et al.* 2001). Récemment, cette régulation a été plus précisément associée à un mécanisme de contrôle de type ARN interférence. En effet, l'inactivation des SINE a été corrélée chez *Arabidopsis* avec la présence de petits ARN spécifiques des SINE (siRNA) d'environ 24 nucléotides (Zilberman *et al.* 2003). Ces petits ARN permettraient de cibler à la fois une ADN méthyltransférase *de novo* de type DRM et une Histone MéthylTransférase (HMT) au niveau des loci génomiques SINE (Zilberman, Cao and Jacobsen 2003). Cette HMT méthyle les histones H3 au niveau de la lysine 9, ce qui conduirait notamment au recrutement d'une chromométhylase appelée CMT3. L'action de ces différentes ADN méthyltransférases serait responsable de l'imposition du fort niveau de méthylation ADN détecté au niveau des copies SINE. L'ensemble de ces modifications seraient impliquées dans l'inactivation des éléments SINE.

V.3. Régulation post-transcriptionnelle

La séquence de l'élément SINE ne possède pas de signal de fin de transcription de l'ARN polymérase III de type « TTTT ». La transcription de l'élément se termine donc au niveau du signal de fin de transcription apporté par la région génomique flanquant l'élément. Pourtant ces transcrits primaires « pleine longueur » ne sont pas les seuls présents dans la

cellule. En effet, pour les SINE B1 de rongeur et Alu humain, des transcrits tronqués juste en amont de la région poly(A) sont majoritairement détectés dans le cytoplasme (Adeniyi-Jones and Zasloff 1985; Maraia *et al.* 1993). Un tel clivage de l'ARN SINE doit avoir pour but d'empêcher sa rétroposition en supprimant la queue poly(A) qui est nécessaire à la prise en charge d'un ARN SINE par les protéines du LINE. Un phénomène similaire de régulation post-transcriptionnelle a également d'être mis en évidence pour les SINE de type ARNt chez les plantes (Pelissier *et al.*, 2004).

VI. Les familles de SINE de Brassicaceae.

La famille des Brassicaceae, anciennement nommées Crucifères, est une importante famille de plantes dicotylédones. En classification classique, cette famille comprend 3200 espèces réparties en 350 genres. Ce sont essentiellement des plantes herbacées surtout présentes dans l'hémisphère nord tel que *Brassica oleracea* (le chou), *Brassica napus* (le colza) et la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

La première famille de SINE identifiée chez les Brassicaceae a été découverte chez *Brassica napus* et s'appelle SB1 (Deragon *et al.* 1994). Depuis, il a été montré que cette famille est présente chez l'ensemble des *Brassica*, alors qu'elle est absente du génome d'*Arabidopsis thaliana*. À ce jour, 15 familles de SINE ont été identifiées chez les Brassicaceae : SB1 à SB15 (Deragon and Zhang 2006). Comme tous les SINE de plantes, les SINE de Brassicaceae ont une région 5' dérivée d'ARN de transfert. La taille de leur séquence consensus est très variable, en raison des variations de longueur de leur région corps non-apparentée à l'ARNt. Au contraire d'autres SINE de plantes, ils possèdent tous une queue poly(A).

La séquence partielle du génome de *Brassica oleracea* compte 4600 copies réparties en 14 familles (SB1 à SB3 et SB5 à SB15), représentant 0,2% du génome (environ 600 millions de paires de bases). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* (130 millions de paires de bases) compte quant à lui 334 copies réparties en six familles (SB2 à SB7), représentant 0,07% du génome. Chez *Arabidopsis*, les éléments des familles SB2 et SB3 (deux des familles les plus représentées) se trouvent dans des régions géniques, alors qu'ils sont

pratiquement absents des régions centromériques et péricentromériques, où se trouvent de nombreux autres éléments transposables (Lenoir *et al.*, 2001).

VII. Impact cellulaire des SINE.

VII.1. Impact génomique.

Les éléments SINE peuvent s'insérer à n'importe quel endroit du génome et ainsi modifier l'expression d'un gène ou peuvent être à l'origine de réarrangements de l'ADN suite à des recombinaisons impliquant plusieurs copies. Ainsi, de nombreuses pathologies humaines causées par la présence d'un élément SINE à l'intérieur de la partie codante d'un gène ont été décrites (Labuda *et al.* 1995). Ainsi, chez l'homme, le SINE Alu a été trouvé à l'origine de certains cancers du sein héréditaires en altérant l'expression des gènes BRCA1 ou BRCA2 (Montagna *et al.* 1999). Dans des cellules somatiques, une insertion d'Alu dans le gène codant pour la protéine anti-tumorale p53 peut être à l'origine de processus de tumorigénération (Slebos *et al.* 1998).

L'insertion d'un élément SINE n'a pas seulement des effets négatifs pour le génome, il peut être un véritable acteur de la diversité. Les SINE peuvent en effet influencer l'activité des promoteurs adjacents en recrutant des facteurs transactivateurs ou en modifiant le niveau de méthylation de ces régions (Babich *et al.* 1999; Arnaud *et al.*, 2000). D'autre part, la présence d'un élément SINE à l'intérieur d'un intron peut modifier l'épissage de certains transcrits (Makalowski *et al.* 1994). Même si certains de ces événements peuvent avoir un impact négatif à court terme, ils augmentent la plasticité du génome et peuvent donc, dans une certaine mesure, être considérés comme un moteur de l'évolution (Bailey *et al.* 2003).

VII.2. Activation des SINE au cours d'un stress.

L'expression de certains SINE de mammifères et d'insectes est fortement augmentée en condition de stress tel que le choc thermique et après traitement avec de la cycloheximide (un inhibiteur de la synthèse des protéines eucaryotes), de l'éthanol et des agents endommageant de l'ADN (cisplatine et radiation gamma) (Fornace and Mitchell 1986; Kimura *et al.* 1999;

Liu *et al.* 1995; Li *et al.* 1999; Rudin and Thompson 2001). Certaines infections virales conduisent également à l'activation de la transcription des éléments SINE. C'est le cas du Simian Virus SV40, du virus de l'herpes, de l'adénovirus et du parvovirus (Singh *et al.* 1985; Jang and Latchman 1989; Panning and Smiley 1993; Williams *et al.* 2004). Ces expériences ont montré l'activation des SINE chez différentes espèces : l'élément Alu chez l'homme, les éléments B1 et B2 chez les rongeurs et l'élément Bm1 chez le ver à soie. Cela suggère que la réponse des éléments SINE au cours d'un stress est un mécanisme conservé et donc que les SINE ont un rôle biologique dans la cellule.

VII.3. Rôle riborégulateur des SINE.

VII.3.1) Le contrôle de la transcription via l'ARN polymérase II.

Les ARN SINE de mammifères sont capables d'inhiber la transcription des gènes codés par la polymérase II (pol II). En effet, suite à un choc thermique, les transcrits du SINE B2 s'accumulent rapidement dans les cellules de souris. Cet ARN est alors capable d'interagir avec l'ARN polymérase II ce qui conduit à son inhibition (Allen *et al.* 2004; Espinoza *et al.* 2004). Il semble que la fixation du transcrit SINE empêche l'association correcte de la polymérase à l'ADN au niveau du promoteur (Espinoza *et al.* 2007). Récemment, une étude a montré que l'élément SINE Alu pouvait aussi inhiber la transcription pol II à la suite d'un choc thermique (Mariner *et al.* 2008). Cela suggère que la fonction de régulation de la transcription des éléments SINE est un mécanisme conservé entre les espèces.

VII.3.2) Le contrôle de la traduction via la kinase PKR.

Dans des cellules humaines, l'ARN de l'élément SINE Alu est capable d'interagir avec la protéine kinase PKR ce qui conduit à réguler sa fonction (Chu *et al.* 1998). La PKR est activée par une molécule d'ARN double brin comme les ARN viraux qui sont produits au cours d'une infection virale. Lorsqu'elle est activée, la kinase subit une première étape d'autophosphorylation puis va phosphoryler la sous-unité alpha du facteur 2 d'initiation de la traduction eucaryote (eIF2 α) ce qui entraîne une inhibition de la synthèse des protéines (de

Haro *et al.* 1996). Il s'agit d'un mécanisme développé par la cellule afin d'empêcher la traduction des ARN viraux afin de limiter l'infection. L'ARN du SINE, en s'associant avec la PKR, peut bloquer l'autophosphorylation de la protéine laquelle ne peut alors plus phosphoryler eIF2 α (Chu *et al.*, 1998).

Il est proposé que l'accumulation de transcrit SINE à la suite d'un stress permettrait à la cellule d'empêcher la diminution de la traduction provoqué par l'activation de la PKR. Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par le fait que le cycloheximide, un agent provoquant l'activation de l'expression du SINE Alu, conduit aussi à l'inhibition de l'activité de la PKR (Chu *et al.*, 1998). Cependant, l'inhibition de la traduction par la PKR initiée par la présence d'ARN viraux est un moyen de limiter la propagation de l'infection virale. Or, on a vu précédemment que certains virus provoquaient aussi l'accumulation de transcrit SINE dans les cellules. Il est donc envisageable que les virus aient développé ce moyen pour venir empêcher l'inhibition de la traduction lorsqu'ils expriment leurs ARN.

Une autre étude a montré que l'ARN Alu en condition de stress abiotique est aussi capable de stimuler la traduction d'ARNm néosynthétisés par une voie inconnue mais indépendante de la PKR (Rubin *et al.* 2002). Les auteurs proposent un modèle dans lequel l'ARN Alu stimulerait l'expression des ARNm qui n'étaient pas jusqu'alors engagés dans la machinerie de traduction. Ceci permettrait à la cellule de traduire des ARNm spécifiques de la réponse au stress rapidement et une fois revenue en conditions normales de reprendre la traduction des ARNm engagés dans la machinerie de traduction avant le stress.

VII.3.3) La fonction riborégulatrice des SINE chez la plante.

A ce jour on ne dispose que de peu d'information sur une éventuelle fonction cellulaire des éléments SINE dans le règne végétal. Cependant, une étude réalisée au laboratoire a montré que la surexpression du SINE SB1 chez *Arabidopsis thaliana* conduit à l'apparition de graves défauts de développement (Pouch-Pelissier *et al.* 2008). Cette étude a aussi permis de montrer que l'ARN de SB1 interagit avec la protéine HYL1 (DRB1), une protéine de liaison à l'ARN double brin qui intervient dans la production des miRNA (micro ARN) et des tasiRNA (trans-acting small interfering RNA). L'accumulation des miRNA et des tasiRNA dépendant de HYL1 est d'ailleurs modifiée dans des plantes surexprimant le

SINE. Il semble donc que les SINE sont capable de moduler l'activité de certaines voies du RNAi chez les plantes.

Partie II : La protéine Rétinoblastome : lien entre cycle cellulaire et croissance.

Nous venons de voir que chez les mammifères, l'infection par l'adénovirus conduit à l'activation de la transcription de l'élément SINE Alu. Or, ce virus code pour une protéine, E1A qui est capable d'interagir avec la protéine Rétinoblastome (RB). Il est probable que l'activation transcriptionnelle des éléments SINE à la suite d'une infection virale passe par l'inactivation de RB.

La protéine RB joue un rôle central dans la cellule. Cette protéine est tout d'abord un composant majeur du mécanisme de contrôle du cycle cellulaire. Son inactivation par des protéines virales conduit en effet à la dérégulation du cycle cellulaire. D'autre part, RB intervient dans le processus de croissance cellulaire. Pour cela, il contrôle la transcription médiée par l'ARN polymérase III (pol III). Ainsi, chez les mammifères, certaines protéines virales vont agir négativement sur RB ce qui a pour conséquence de déréguler le cycle cellulaire, la transcription pol III de manière générale et la transcription des éléments SINE en particulier. L'activation de la croissance cellulaire et du cycle cellulaire permet alors de mettre à disposition du virus la machinerie de réplication de la cellule hôte ainsi que la machinerie de traduction.

Chez les plantes, l'activation de la transcription des éléments SINE à la suite d'un stress comme l'infection virale reste à démontrer. Cependant, certains virus encodent au sein de leurs génomes des protéines possédant un domaine de liaison à RB similaire à celui retrouvé chez E1A d'adénovirus. Il semble donc envisageable que dans le monde végétal, l'infection par un virus possédant une protéine de liaison à RB conduise à l'activation du cycle cellulaire, de la transcription pol III en général et de la transcription des éléments SINE.

I. Généralités.

Le gène rétinoblastome (RB) a d'abord été caractérisé comme un gène suppresseur de tumeur chez l'enfant. En effet, sa mutation a été associée à une forme rare de tumeur maligne de l'œil appelée rétinoblastome (Friend *et al.* 1986). La perte ou la mutation du gène rétinoblastome est trouvée dans de rares cas de cancer, mais une altération dans les voies d'activation de RB est trouvée dans la majorité des cancers suggérant que la perte du contrôle de la protéine RB est un processus central dans le développement tumoral (Bookstein *et al.* 1990, Fung *et al.* 1987, Lee *et al.* 1988).

Le gène rétinoblastome encode une phosphoprotéine, RB, capable de contrôler la division et la croissance cellulaire. La fonction principale de cette protéine est de faire le lien entre le cycle cellulaire et la machinerie transcriptionnelle. Pour cela, elle va réguler l'expression d'un grand nombre de gènes lesquels sont responsables du passage de la cellule à travers certaines phases critiques du cycle cellulaire (Weinberg 1995). Parallèlement, elle va aussi contrôler la synthèse protéique en régulant les gènes transcrits par les ARN polymérases I et III.

A ce jour, peu d'informations sont disponibles concernant le cycle cellulaire chez les plantes. Dans le monde végétal, des gènes codant pour des homologues de la protéine RB ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces de plantes supérieures telles que le maïs, le tabac et *Arabidopsis thaliana* mais également chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Grafi *et al.* 1996, Kong *et al.* 2000, Nakagami *et al.* 1999, Umen and Goodenough 2001). L'inhibition de la fonction RB chez la plante stimule le cycle cellulaire et retarde la différenciation (Park *et al.* 2005). La présence d'une protéine RB fonctionnelle est d'ailleurs nécessaire pour la formation des gamètes femelles chez *Arabidopsis* (Ebel *et al.* 2004). Enfin, la surexpression de la protéine RB inhibe la division cellulaire (Gordon-Kamm *et al.* 2002). Ces observations suggèrent que la voie de contrôle de cycle cellulaire par la protéine RB est conservée entre mammifères et plantes.

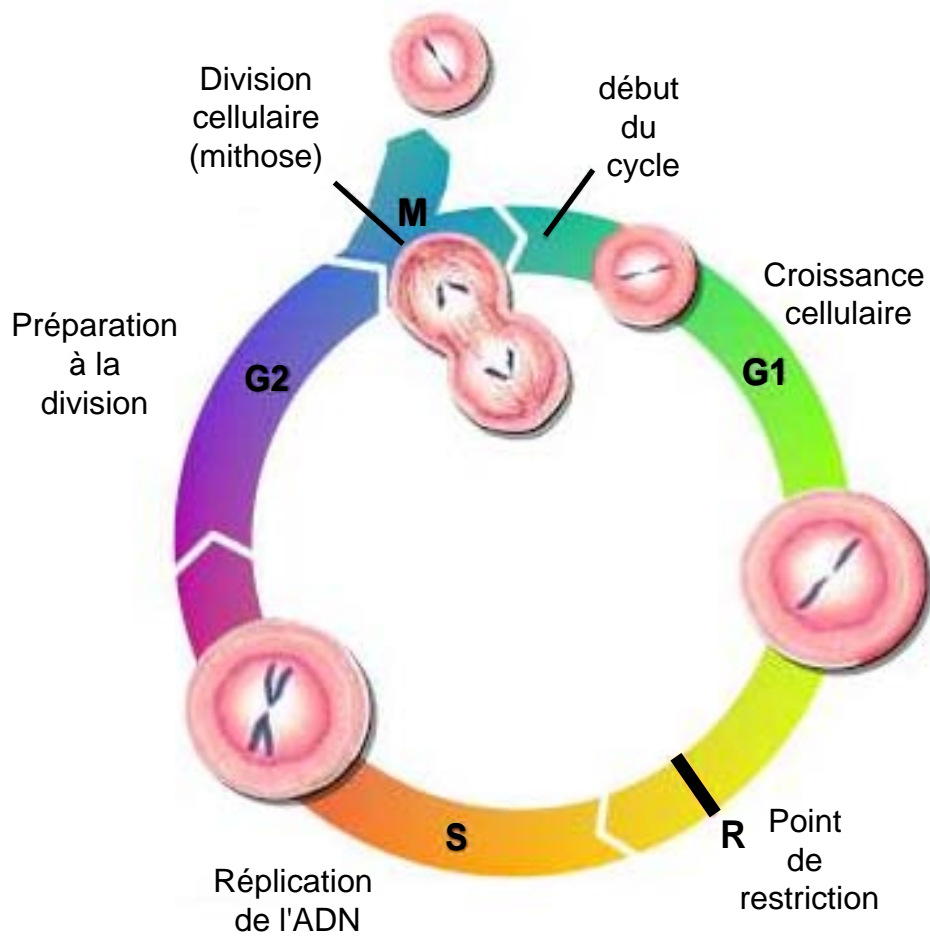
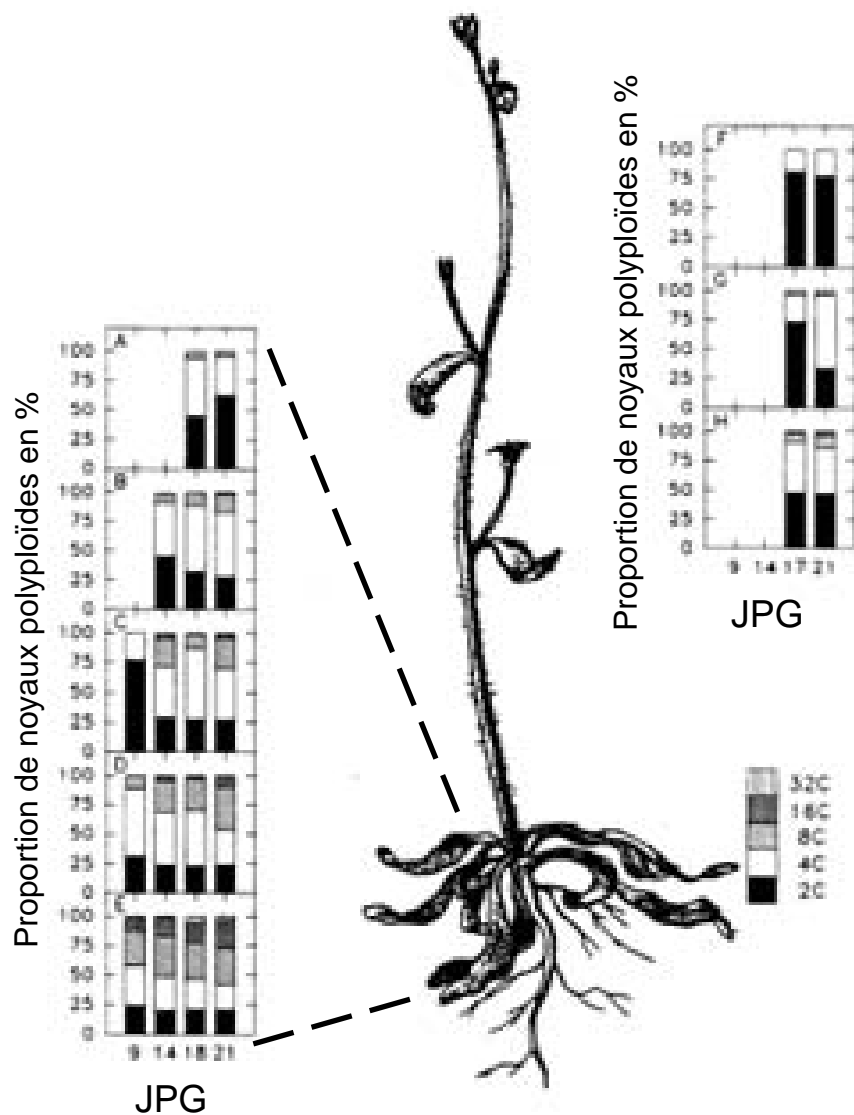


Figure 4: Les phases du cycle cellulaire.

II. Le cycle cellulaire.

II.1. Généralités.

Le cycle cellulaire est traditionnellement divisé en deux grandes phases : l'interphase pendant laquelle a lieu la réplication de l'ADN et la phase de division, la mitose (M). La réplication de l'ADN (phase S) occupe uniquement une portion de l'interphase. En effet, l'intervalle entre la fin du cycle précédant et le début de la réplication de l'ADN correspond à la phase G1 (Gap1). L'intervalle entre la fin de la réplication de l'ADN et le début de la mitose correspond à la phase G2 (Gap2) (Figure 4). C'est au cours de cette phase G1 que la cellule prend la décision d'entrer dans un processus de réplication de l'ADN et de division cellulaire. La décision se fait en fonction de différents éléments tels que la taille de la cellule, les facteurs de croissance ainsi que l'ensemble des signaux environnementaux. La progression à travers la phase G1 nécessite un important contrôle en particulier en un point spécifique de cette phase, le point de restriction R. Le point de restriction R est un point de contrôle critique qui a lieu à la fin de la phase G1. Après le passage de cette étape clé, la cellule va répliquer son ADN et devient alors insensible aux différents facteurs de croissance, la progression du cycle cellulaire ne peut plus être stoppée que par des anomalies de l'ADN (Branzei and Foiani 2008). Le passage de ce point de contrôle dépend de la phosphorylation progressive de la protéine RB. En effet, selon l'état hypophosphorylé (actif) ou hyperphosphorylé (inactif), RB est capable de réguler l'expression de gènes clés responsables de la progression dans le cycle cellulaire. D'autre part, RB bloque la progression du cycle cellulaire en séquestrant les facteurs de transcription de type E2F. Au contraire lorsqu'il les libère, cela engendre la prolifération cellulaire. En effet, les facteurs de transcription E2F gouvernent l'expression de nombreux gènes nécessaires dans la progression du cycle cellulaire et à la réplication de l'ADN. La voie RB/E2F est considérée comme le principal mécanisme responsable de l'inhibition ou de l'activation de la prolifération cellulaire.



JPG : Jours Post-Germination

Figure 5: La polyplœdie chez *Arabidopsis*.

La proportion de noyaux polyplœides est indiquée sous la forme d'un histogramme. La valeur 2C correspond à la quantité d'ADN présent dans un noyau diploïde.

(D'après Nagl *et al*, 1976)

II.2. Le cycle cellulaire chez les plantes.

Même si le processus de division des cellules végétales est très conservé avec celui des autres espèces eucaryotes, les plantes ont développé un certain nombre de particularités. Par exemple, de nombreuses cellules différenciées ont la capacité de se dédifférencier et de devenir pluripotentes ce qui leur permet une plus grande plasticité développementale (Steward *et al.* 1964). D'autre part, la présence d'une paroi rigide entourant la cellule empêche tout mouvement ou migration cellulaire et contrairement aux cellules de mammifères, les cellules de plantes ne développent pas de tumeurs sauf dans certains cas précis de réaction aux pathogènes (Doonan and Hunt 1996). La plus grande particularité des plantes est la capacité de certaines cellules à répliquer leur ADN, éviter la mitose et rentrer à nouveau dans une phase de réplication ce qui constitue l'endoréduplication (Joubes and Chevalier 2000). Ce mécanisme a été observé dans le règne animal mais il est extrêmement fréquent chez les plantes (Nagl 1976). Le niveau de polyploïdie varie ainsi entre les espèces et les tissus (Figure 5). Une cellule en interphase possède généralement une quantité d'ADN fixe correspondant à la valeur 2C. Chez *Arabidopsis*, des noyaux avec un contenu en ADN de 32C sont détectés alors que dans certaines cellules de l'endosperme du maïs le contenu en ADN peut aller jusqu'à 192C (Galbraith *et al.* 1991, Kowles and Phillips 1985). La fonction physiologique de l'endoréduplication reste encore à déterminer mais plusieurs hypothèses ont été formulées. Il est possible que l'endoréduplication joue un rôle dans le processus de différenciation d'une cellule. Par exemple, la croissance des trichomes, le développement de la feuille et du fruit sont toujours associés à un processus d'augmentation de leur contenu en ADN (Joubes *et al.* 1999, Melaragno *et al.* 1993). Le cycle cellulaire classique et le processus d'endoréduplication ont la phase de réplication de l'ADN en commun et utilisent probablement la même machinerie. D'ailleurs la surexpression de gènes connues pour stimuler la réplication de l'ADN induisent à la fois la division et l'endoréplication (Schnittger *et al.* 2002a). Ainsi, la décision de réaliser un cycle cellulaire normal ou de rentrer dans un processus d'endoréduplication se fait probablement à la transition entre la phase G2 et la phase M et dépend de la présence d'un ou plusieurs facteurs MIF (Mitosis Inducing Factor) (De Veylder *et al.* 2002). Les facteurs MIF sont probablement constitués d'un ou plusieurs couples cycline/CDK. En effet chez *Arabidopsis*, des inhibiteurs de CDK sont capable de réguler l'endoréduplication (Verkest *et al.* 2005).

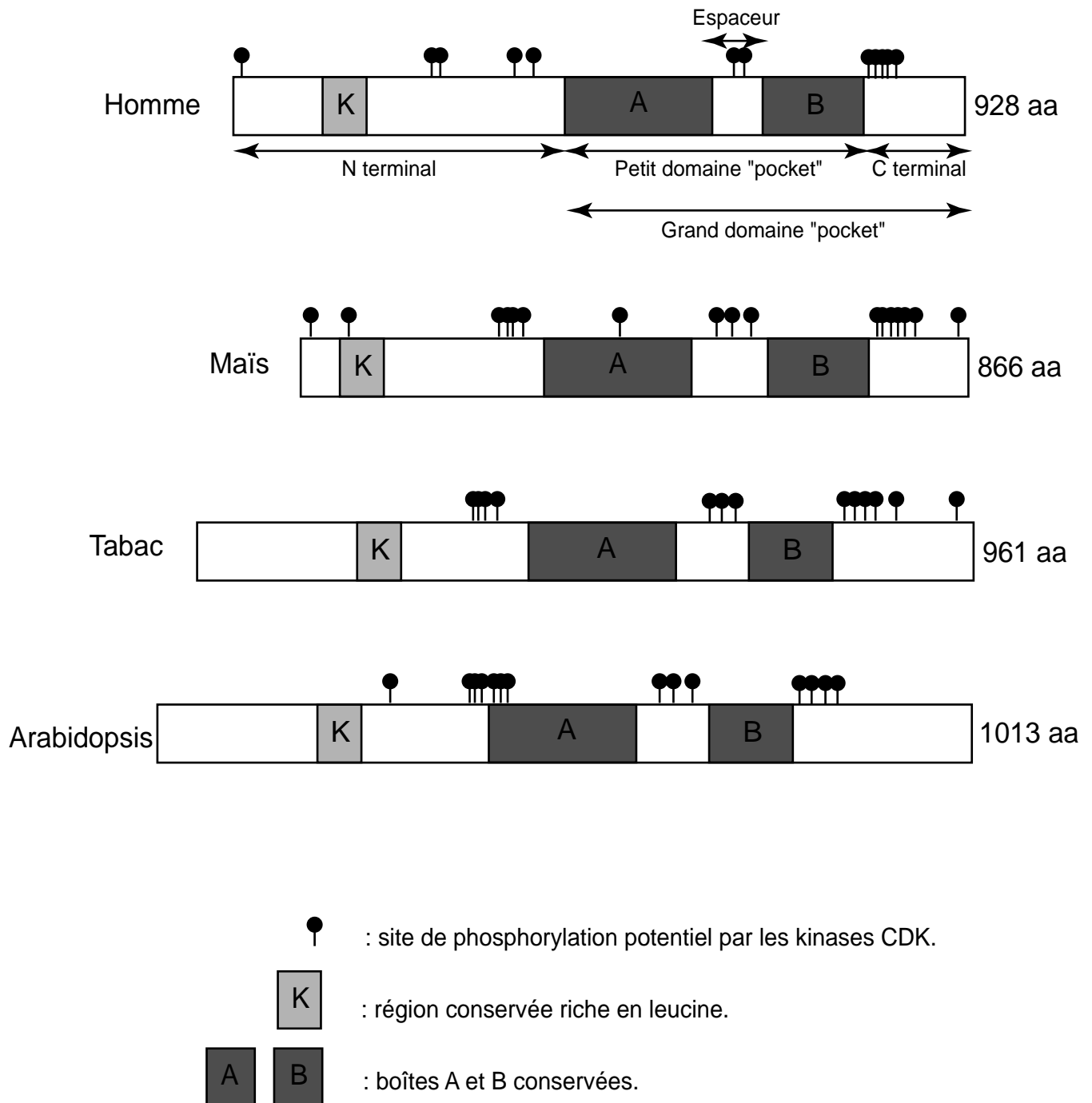


Figure 6: Structure de la protéine RB chez l'homme et les plantes.

Les domaines conservés entre la protéine RB chez l'homme, le maïs, le tabac et *Arabidopsis thaliana* sont représentés ainsi que les sites potentiels de phosphorylation par les CKD. La taille des protéines est indiquée en nombre d'acides aminés

(D'après Durfee *et al*, 2000)

III. Les caractéristiques de la protéine RB.

Chez l'homme, la protéine RB est constituée de 928 acides aminés et comporte de 3 domaines fonctionnels. Le domaine amino-terminal de 379 acides aminés, le petit domaine « pocket » central de 413 acides aminés constitué des boîtes A et B et le domaine carboxy-terminal de 136 acides aminés (Figure 6).

Les protéines RB de plantes ont conservé cette structure en trois grands domaines (Durfee *et al.* 2000). Cependant, la conservation de la séquence primaire diverge en fonction des domaines. La plus forte homologie entre les protéines de mammifères et les protéines de plantes se trouve au niveau du domaine « pocket » avec une identité de l'ordre de 20 à 35% (Figure 6).

III.1. Le domaine amino-terminal (N terminal).

La fonction de ce domaine reste controversée. En effet des études semblent indiquer que ce domaine possède des propriétés de suppresseur de tumeur alors que d'autres expérimentations semblent indiquer le contraire (Riley *et al.* 1997, Xu *et al.* 1994).

De nombreuses expériences de double hybride ont également mis en évidence l'importance de ce domaine dans la liaison à des partenaires protéiques jouant un rôle important dans les différentes fonctions de RB. Ainsi, RB interagit avec la protéine MCM7 (minichromosome maintenance 7) nécessaire à l'initiation de la réplication et avec la protéine p84N5 laquelle interviendrait dans le processus apoptotique (Sternier *et al.* 1998; Lei and Tye 2001; Durfee *et al.* 1994; Doostzadeh-Cizeron *et al.* 1999). La capacité de RB à réguler négativement la réplication de l'ADN et la mort cellulaire passerait donc par la séquestration de ces deux protéines.

Chez les plantes, le domaine N-terminal a une longueur variable et on peut noter l'existence d'une région conservée riche en leucine de fonction inconnue entre les protéines RB des mammifères et les protéines de plantes au niveau de ce domaine N-terminal (Durfee, Feiler and Grussem 2000) (Figure 6).

humain	451	VEIGSQRYKLGVRLLYYRVMESMLKSEERLSIQNFSKLLNDNIFHMSLLACALEVMATY	498	Boîte A
souris	445	VDIGVQRYKLGVRLLYYRVMESMLKSEERLSIQNFSKLLNDNIFHMSLLACALEVMATY	492	
poule	441	AEIGSQRYQLGVRLLYYRVMESMLKSEERLSVHNFSKLLNDNIFHTSELACALEVMATY	488	
xénope	440	AEIGYQRYKLGVCLLYYRVMESAILKTEERLSVHNFSKLLNDNIFHICLLACAVEVWASY	499	
maïs	11	IPWAEARKVEASKLLYYRVLEAICRAELQNSNVNNTPLDSNERFHRCLINCSADLWLATHK	72	
Humain p107	321	IDFAVNRLKLAEIYYKILSTVMVQETRLHGMDSVLGEQDIFHRSIMACCLELFLFAYS	382	Boîte A
Humain p130	438	KEIASKHFRFAEMYYKVLSEVIEQKRLGDMDSLGLGEQDNFHRSLACCLEVVTFSYK	488	
humain	514	FPWILNVLNLKAPDFYKVIETSFKAEGNLTREMIKHLEROEHRIMESIAWLSDSPDFD	571	
souris	508	FPWILNVLNLKAPDFYKVIETSFIKVEAMLTREMIKHLEROEHRIMESIAWLSDSPDFD	565	
poule	506	FPWILNVFDLKAPDFYKVIETSFIKVPSITRDMIKHLEROEHRIMESIAWQSDSPDFD	563	
xénope	515	FPWILRAFEIKAPDFYKVIETCFKAEPSTSNMIKYDEROEHQIMECLAWQSDSPDFD	572	Boîte A
maïs	77	PPAVLESTGLTAFDLSKILSTNFRHEETPRELKRHLNLSIEQLLESMAWEKGSLSYNSL	143	
Humain p107	386	FPWIEVLNLQPPYFYKVIENVIRSEEGSRDMVKHNSIEQILESIAMSHDSAMWEAL	452	
Humain p130	493	FPFITEIFDVPLYHFKVLEVFIRAEDGUCREVVKHLNQIEQILDHLAKKPEEPWEKI	552	
humain	647	LSLFYKRVYRLAYLRLNTLCERLLSEHPELEHI IWTLFQHTLQNEYELMRDHLDDIMMCSMYG	710	Boîte B
souris	639	LALFYKRVYRLAYLRLNTLCARLLSDHPELEHI IWTLFQHTLQNEYELMRDHLDDIMMCSMYG	702	
poule	639	LSLFYKRVYRLAYLRLHTLFFRLLSEHPDLEPLIWTLFQHTLQNESELMRDHLDDIMMCSMYG	702	
xénope	648	LSLFYKRVYLLAYKRLSSLCSSLLSDHPELEQVITLLQHTLQOEYELMRDHLDDIMMCSMYG	711	
maïs	257	IHIFFSKILKFPPIRIRNLCEVQCVEQTER--VYNVFKQILEQQTTFFNHIDQLILACLYG	318	
Humain p107	655	LALFYKRVYHLASVHLRDLCLKLDVSNELRRK-IWTCFEFTLVHCPDLAKDHLDDILLAFYI	717	Boîte B
Humain p130	779	LSLFYKRVYHLAAVHLRDLCAKLDISDELRRK-IWTCFEFSIIQCPDLMDHLDDILLMAIYV	841	
humain	711	IQKVKNIDLKFKIIVTAKDLPHAVQETFKRVLIKEEYD-----SIIVFYNLSVFMQRLMT	766	
souris	703	IQKVKNIDLKFKIIVTAKDLPHAAQETFKRVLIREEBFD-----SIIVFYNLSVFMQRLMT	758	
poule	703	IQKVKNVDLREKTIIVSAVKELPNTNQETFKRVLIREEQYD-----SIIVFYNLSVFMQRLMT	758	
xénope	712	IQKAKNIDLREKTIIVTAKGLTNTNQETFKHVLIRDGQHD-----SIIVFYNLSVFMQRLMT	767	Boîte B
maïs	319	VAVVCQELTIRELLNNYKREAQCKPEVFSSIIYIGSTNRNGVLVSRHVGIIITFNEVFVPAKFP	382	
Humain p107	718	MAVVTKEERTIQEIMKSYRNQPOANSHVYRSV-----DLKQVNTIYVGRVRS	811	
Humain p130	842	MAVVTKEKSKQNIMRCVTRTQPOARSQVYRSV-----DLKQVNTIYVGRVRS	962	

Figure 7: Comparaison de séquences des boîtes A et B des protéines RB.

Alignement de la séquence en acides aminés de la protéine RB humaine et de ses homologues chez la souris, la poule, le xénope et le maïs. La séquence des deux autres protéines humaines à domaine "pocket" p107 et p130 est également présentée. La position des boîtes A et B est indiquée.

III.2. Le petit domaine « pocket ».

Le petit domaine « pocket » a été initialement identifié comme le fragment minimal de RB capable d'interagir avec les protéines virales à domaine LxCxE (Leucine-x-Leucine-x-Acide Glutamique) tel que le grand antigène T du virus SV40, la protéine E7 du virus HPV ou la protéine E1A des adenovirus (Hu *et al.* 1990, Huang *et al.* 1990, Kaelin *et al.* 1990). Ce domaine est composé des boîtes A et B séparées d'un espaceur peu conservé. Les domaines A et B ont une séquence en acides aminés très conservée entre les espèces (Lee *et al.* 1998) (Figure 7). Ces deux domaines sont capables d'interagir ensemble afin de former une poche : le domaine « pocket » (Chow and Dean 1996). L'interaction entre ces deux domaines est d'ailleurs nécessaire à la fonction de la protéine (Qin *et al.* 1992). En effet, le domaine A est indispensable au domaine B afin d'assurer la bonne conformation de ce dernier (Kim and Cho 1997, Lee, Russo and Pavletich 1998). Le site de fixation des protéines à domaine LxCxE se situe au niveau du domaine B (Lee, Russo and Pavletich 1998). De nombreuses oncoprotéines virales contiennent un motif LxCxE leur permettant de s'associer à la protéine RB (Dyson *et al.* 1989, Lee, Russo and Pavletich 1998, Ludlow *et al.* 1989, Whyte *et al.* 1988). Certaines protéines endogènes interagissent aussi avec la protéine RB via un domaine « LxCxE-like ». C'est le cas des histones déacétylase HDAC1 et HDAC2, et de l'ATPase BRG1 du complexe de remodelage des nucléosomes SWI/SNF (Switch [SWI]/sucrose non-fermenting [SNF]) (Dunaief *et al.* 1994; Brehm *et al.* 1998, Luo *et al.* 1998, Magnaghi-Jaulin *et al.* 1998). Le site de liaison aux protéines à domaine LxCxE n'est cependant pas le seul site de liaison du domaine « pocket ». En effet, les facteurs de transcription de la famille E2F (adenovirus E2 promoter binding Factor) interagissent à la fois au niveau du domaine « pocket » et de la région carboxy-terminale (Huang *et al.* 1992). C'est d'ailleurs grâce à cette capacité d'interaction avec les facteurs E2F que RB joue un rôle si important dans le contrôle du cycle cellulaire (Harbour and Dean 2000).

Le grand domaine « pocket » est constitué du petit domaine « pocket » ainsi que de la majeure partie du domaine carboxy-terminal. Il représente la structure minimale capable de compléter l'activité suppresseur de tumeur de RB (Yang *et al.* 2002).

Le domaine « pocket » et en particulier les boîtes A et B sont très conservés entre les plantes et les mammifères ce qui suggère que ce domaine a gardé ses propriétés (Figure 7). La protéine RB de maïs est d'ailleurs capable de s'associer avec les facteurs E2F de l'homme ainsi qu'avec le grand antigène T du virus SV40 et la protéine E7 du virus HPV (Huntley *et al.* 1998). Plus récemment, la liaison entre la protéine RB de maïs et un facteurs E2F de blé a été mise en évidence par des expériences de double-hybride chez la levure (Ramirez-Parra *et al.* 1999, Sekine *et al.* 1999). Cela suggère que les protéines RB des plantes possèdent un domaine « pocket » fonctionnel lui permettant d'interagir avec des protéines à domaines LxCxE ainsi qu'avec des facteurs de la famille E2F.

III.3. Le domaine Carboxy-terminal (C terminal).

Le domaine C terminal de la protéine RB possède un motif de liaison à la protéine kinase dépendante des cyclines, la protéine CDK4, laquelle joue un rôle essentiel dans le contrôle de la fonction RB en jouant sur son niveau de phosphorylation (Wallace and Ball 2004).

Le domaine C terminal est crucial dans la fonction et la régulation de la protéine RB. Cette région, en collaboration avec les domaines A et B, est essentielle pour l'interaction avec de nombreuses protéines tel que l'oncoprotéine MDM2 et la tyrosine kinase c-abl (Welch and Wang 1993, Xiao *et al.* 1995). Ce domaine contient d'ailleurs de nombreux résidus sérines et thréonines qui lorsqu'ils sont phosphorylés entraînent l'inactivation de la protéine (Lees *et al.* 1991) (Figure 6).

Peu d'informations sont disponibles sur la fonction du domaine C terminal chez les plantes. Cependant, tout comme pour les protéines des mammifères, on retrouve la présence de nombreux résidus phosphorylables suggérant que le rôle de ce domaine dans la régulation de la protéine RB est conservé dans le règne végétal (Figure 6).

IV. Contrôle de RB par la phosphorylation.

En fonction de son niveau de phosphorylation, RB est capable de bloquer le cycle cellulaire en phase G1. Il s'agit donc d'une protéine essentielle dans le contrôle du cycle cellulaire. La protéine RB est une protéine proto-oncogène responsable de l'apparition de tumeurs lorsque son expression est altérée ou lorsque cette protéine est constitutionnellement phosphorylée (Sherr 1996). En effet, dans les cellules en phases G0 et G1, RB est présente sous sa forme hypophosphorylée alors que dans les cellules en phases S et M, RB est fortement phosphorylée (Buchkovich *et al.* 1989, Chen *et al.* 1989).

L'analyse de la protéine a montré plus de 20 sites de phosphorylation différents aussi bien au niveau de résidus serines que thréonines (Lees, Buchkovich, Marshak, Anderson and Harlow 1991, Lin *et al.* 1991). Parmi ceux-ci, on trouve 16 sites potentiels de phosphorylation par les kinases dépendantes des cyclines de types CDK (Brown *et al.* 1999). Ces sites de phosphorylations se trouvent près du début du domaine « pocket », dans la région espaceur ainsi que dans le domaine carboxy-terminal (Figure 6). Ainsi, des protéines kinases dépendantes des cyclines phosphorylent RB en fin de phase G1 provoquant son inactivation. En fin de mitose, des phosphatases déphosphorylent à leur tour la protéine RB qui redevient alors pleinement fonctionnelle (Mittnacht 1998).

Tout comme leurs homologues mammifères, les protéines RB de plantes possèdent de nombreux sites potentiels de phosphorylation par les kinases de type CDK suggérant que la régulation de la fonction RB au cours du cycle cellulaire se fait de manière similaire (Durfee, Feiler and Grusis 2000) (Figure 6). En effet une activité kinase de type CDK a été mise en évidence dans différentes cellules de plantes en fin de phase G1 et en début de phase S. Ainsi, il semble que comme chez les mammifères, la phosphorylation de la protéine RB est responsable du contrôle de la progression du cycle cellulaire chez les plantes.

IV.1. Phosphorylation de RB au cours du cycle cellulaire chez les mammifères.

IV.1.1) Phosphorylation de RB via la voie cyclin D/CDK4 et CDK6.

Les cyclines de classe D (D1, D2 et D3) sont les principaux acteurs impliqués dans la phosphorylation de la protéine RB. Ces cyclines sont des régulateurs des kinases CDK4 et CDK6. Ainsi, en début de phase G1, les cyclines de classe D s'associent avec les protéines CDK4 /6 afin d'activer leur activité kinase provoquant la phosphorylation de RB et par conséquent l'entrée dans un nouveau cycle cellulaire (Kato *et al.* 1993).

Les cyclines D1 et D3 contiennent un motif LxCxE décrit comme permettant l'association avec la protéine RB (Dowdy *et al.* 1993). Cependant, une cycline D1 mutée dans son domaine LxCxE reste capable d'induire la phosphorylation de RB signifiant que le complexe Cycline D/CDK4 ne s'associe pas à RB uniquement via ce domaine LxCxE (Horton *et al.* 1995). Plus récemment, une étude a montré qu'il existait un motif de liaison à la kinase CDK4 dans la partie carboxy-terminale de la protéine RB. Ce motif est d'ailleurs nécessaire pour la phosphorylation efficace de RB au cours de la phase G1 du cycle cellulaire (Wallace and Ball 2004).

L'accumulation des cyclines de classe D passe par des contrôles transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels. Les voies Ras et c-Myc semblent avoir un rôle prépondérant en activant la transcription de certaines cyclines (Albanese *et al.* 1995, Amanatullah *et al.* 2001, Filmus *et al.* 1994, Bouchard *et al.* 1999).

IV.1.2) Phosphorylation de RB via la voie cyclin E/CDK2.

Les cyclines de classe E semblent également avoir un rôle important à jouer dans le contrôle de la phosphorylation de RB. En effet, l'expression constitutive de la cycline E a pour conséquence la phosphorylation de la protéine RB (Hinds *et al.* 1992). D'autre part, dans la plupart des cellules, le niveau de transcrit et la quantité de protéines de cette classe de cycline augmente fortement vers le milieu de la phase G1 lorsque la protéine RB est progressivement phosphorylée (Koff *et al.* 1991, Lew *et al.* 1991). Cette cycline serait en effet capable de s'associer avec la kinase CDK2 et de phosphoryler la protéine RB même lorsque la voie CyclinD/CDK4/CDK6 est inactivée (Gray-Bablin *et al.* 1996).

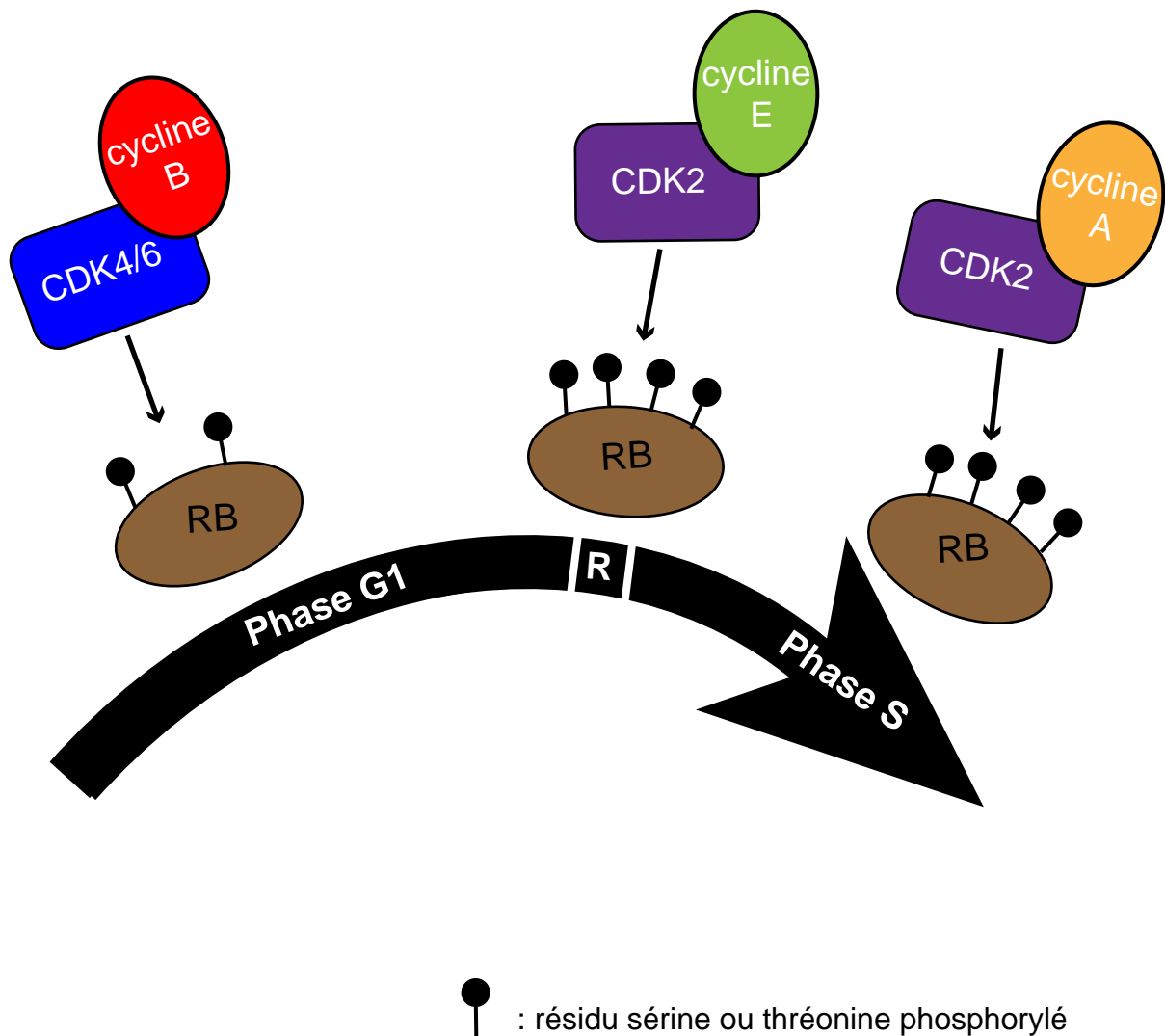


Figure 8: Phosphorylation de RB au cours du cycle cellulaire chez les mammifères.

La protéine RB commence à être phosphorylée en phase G1 par le complexe cycline B/CDK4/6. A la limite entre la phase G1 et la phase S (le point de restriction R), des résidus supplémentaires sont phosphorylés par le complexe cycline A/CDK2. Le niveau élevé de phosphorylation de la protéine RB est maintenu par les complexes cycline A/CDK2 au cours de la phase S.

La reconnaissance de RB par le complexe Cycline E /CDK2 semble faire intervenir différents motifs. Tout d'abord, les cyclines de classe E possèdent un motif de liaison au domaine « pocket » de RB de type LxCxE nécessaire à la phosphorylation de RB (Kelly *et al.* 1998). D'autre part, un motif de liaison potentiel au complexe cyclin E/CDK2 est également présent dans le domaine carboxy-terminal de la protéine RB. La présence de ce motif est elle-aussi essentielle dans la phosphorylation de RB par le complexe Cycline E/CDK2 (Adams *et al.* 1999).

IV.1.3) Phosphorylation de RB au cours du cycle cellulaire.

Le rôle ainsi que les liens entre les cyclines de classe D et de classe E dans l'initiation de la phosphorylation de la protéine RB reste à déterminer. Cependant, il semblerait que les complexes cyclines D/CDK4/CDK6 seraient responsables de la première vague de phosphorylation de certains résidus sérines et thréonines de la protéine RB au cours de la phase G1 (Figure 8). Les complexes Cycline E/CDK2 ne seraient activés qu'à la fin de la phase G1. Ceci est cohérent avec le fait que le promoteur des cyclines de classe E est sous le contrôle de la protéine RB (Geng *et al.* 1996). L'activation transcriptionnelle des gènes codant pour la cycline E à la fin de la phase G1 dépendrait donc de l'activité des cyclines de classe D. Ainsi à la frontière entre la phase G1 et la phase S, le complexe Cycline E/CDK2 viendrait phosphoryler la protéine RB au niveau de résidus sérines et thréonines différents de ceux utilisés par le complexe Cycline D/CDK4/CDK6 provoquant alors une augmentation supplémentaire du niveau général de phosphorylation de la protéine RB (Harbour *et al.* 1999) (Figure 8).

IV.1.4) Rôle des complexes Cycline A/CDK2 et Cycline A/CDC2 dans la phosphorylation de RB.

Les cyclines de classe A ne sont transcrites qu'à partir de la phase S du cycle cellulaire et sont dégradées juste avant la métaphase (Pines and Hunter 1990). Cela signifie qu'elles n'interviennent probablement pas dans le contrôle précoce du cycle cellulaire. Cependant, la cycline A peut s'associer avec la kinase CDK2 ainsi qu'avec la kinase CDC2 (Tsai *et al.*

1991). Le complexe Cycline A/CDK2 est d'ailleurs capable de phosphoryler RB (Ewen *et al.* 1993). Une hypothèse est que ce complexe intervient au cours de la phase S dans le maintien de la phosphorylation de la protéine RB établie par les complexes Cycline D/CDK4/CDK6 et Cycline E/CDK2.

La fonction de contrôle du cycle cellulaire par RB est principalement régulée via des processus de phosphorylation. Cependant, la protéine RB est la cible de nombreuses autres modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation et la sumoylation lesquelles influent également sur les fonctions de la protéine (Chan *et al.* 2001, Ledl *et al.* 2005). Enfin, RB peut être la cible de clivages protéolytiques à la suite d'un signal apoptotique (Tan and Wang 1998).

IV.2. La phosphorylation de RB chez la plante au cours du cycle cellulaire.

Il existe 13 classes de cyclines chez les mammifères (A-L et T) et seulement 7 chez les plantes (A, B, C, D, H, P et T). Parmi celles-ci, il semble que seules les cyclines de type A, B et D interviennent dans la régulation du cycle cellulaire (Francis 2007). Chaque famille de cyclines est souvent composée de plusieurs membres lesquels n'assurent pas forcément la même fonction dans la cellule. Cela met bien en évidence la complexité de la situation chez les plantes. De manière générale, les cyclines de type A seraient impliquées dans tout le déroulement des phases S/G2/M (Imai *et al.* 2006, Wang *et al.* 2004). Cependant, certains gènes codant pour des cyclines de classe A sont activés à la fin de la phase G1 et au début de la phase S (Chaubet-Gigot 2000). Les cyclines B semblent quant à elles contrôler le passage entre les phases G2 et M (Ito *et al.* 1998, Schnittger *et al.* 2002b).

On trouve 10 membres dans la famille des cyclines de classe D chez *Arabidopsis* dont la plupart contiennent un motif de liaison à RB de type LxCxE (Soni *et al.* 1995). Cela suggère que cette classe de cycline serait responsable de l'activation de la voie RB-E2F au cours du passage entre les phases G1 et S. La protéine RB des plantes est d'ailleurs capable de s'associer avec les cyclines de type D et A *in vitro* (Huntley *et al.*, 1998, Roudier *et al.* 2000). L'interaction entre les cyclines de type D et RB permettrait alors le recrutement d'une kinase de type CDK, et donc la phosphorylation de la protéine RB (Nakagami *et al.*, 1999).

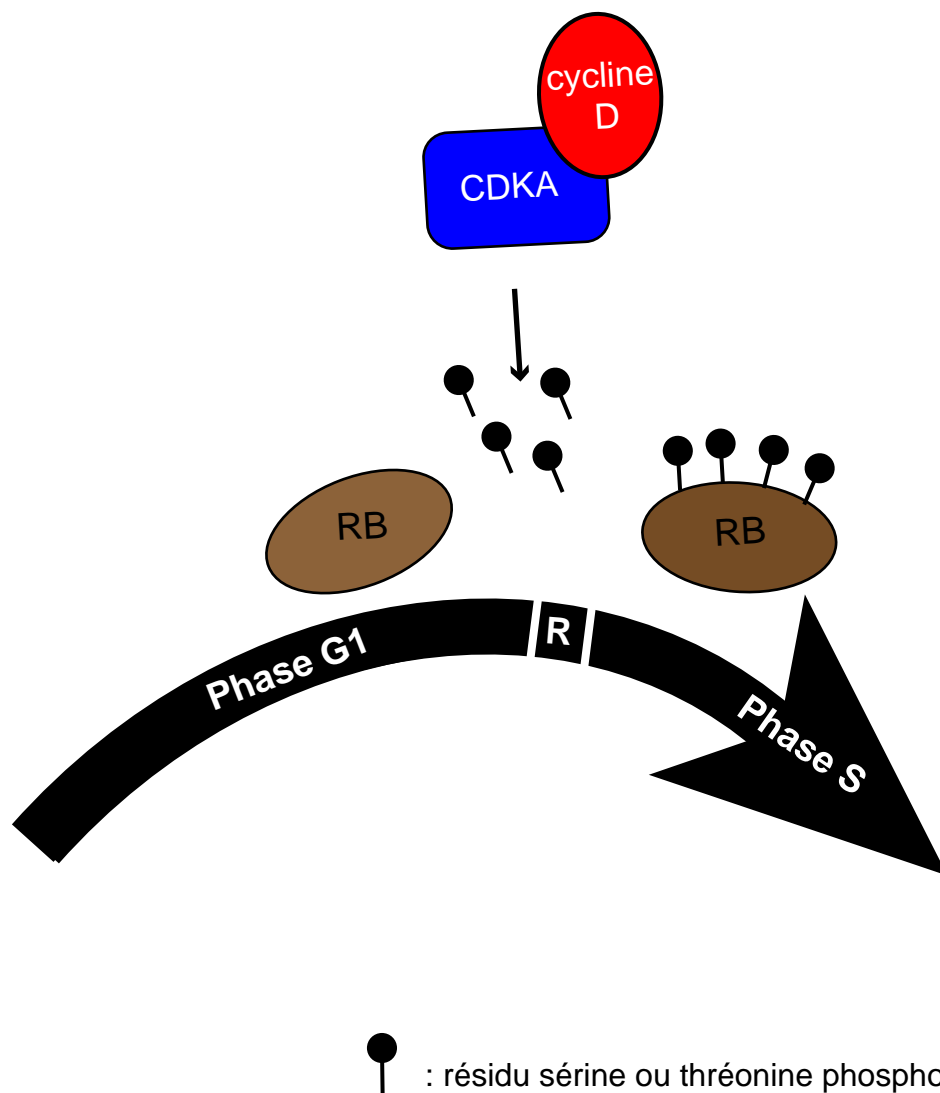


Figure 9: Phosphorylation de RB au cours du cycle cellulaire chez les plantes.

Dans le règne végétal, la phosphorylation de la protéine RB au passage entre la phase G1 et la phase S est réalisée par le couple cycline D/CDKA.

Les gènes codant les cyclines de type D sont induits suite à l'action d'hormones végétales comme les cytokinines ou de nutriments comme le sucrose (Riou-Khamlichi *et al.* 1999). Les plantes semblent donc avoir développé un moyen de moduler leur développement en fonction des conditions de leur environnement. Les hormones de plantes pourraient ainsi faire le lien entre les signaux environnementaux et le déroulement de la division cellulaire.

Aucun orthologue des protéines CDK4 et CDK6, responsables de la phosphorylation de la protéine RB humaine, ne semblent être représenté chez les plantes. Ces dernières possèdent cependant deux types de kinases dépendantes des cyclines intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire: CDKA et CDKB (appelées également CDC2a et CDC2b chez *Arabidopsis*). CDKB est une kinase spécifique des plantes qui semble être surtout active au cours de la phase G2 (Oakenfull *et al.* 2002). La kinase CDKA semble elle être active au cours du passage G1/S et possède un motif de liaison aux cyclines (Oakenfull, Riou-Khamlichi and Murray 2002). CDKA est d'ailleurs capable de s'associer avec les cyclines de type D2 et D3 (Healy *et al.* 2001).

Le model actuel établie que sous l'action des cytokinines, les cyclines de type D seraient produites, s'associeraient avec la kinase CDKA et provoqueraient la phosphorylation de la protéine RB au cours de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire (Boniotti and Gutierrez 2001) (Figure 9).

V. Déphosphorylation de la protéine RB au cours du cycle cellulaire.

Le retour de la protéine RB à un état hypophosphorylé a lieu au cours de la phase de mitose (phase M). Cette étape de déphosphorylation se fait via l'activité de la protéine phosphatase 1 (PP1) (Nelson *et al.* 1997). Ainsi durant la phase de division, RB est déphosphorylée par PP1 ce qui a pour conséquence d'activer à nouveau sa capacité à bloquer le cycle cellulaire en phase G1/G0 (Ludlow *et al.* 1993). Cette étape de déphosphorylation est séquentielle, les sites phosphorylés par le complexe Cyclin D/CDK4 sont les premiers touchés par PP1 (Rubin *et al.* 2001). La déphosphorylation de RB se fait donc sur des résidus bien spécifiques et avec un contrôle temporel très précis suggérant que le passage de la phase M à la phase G1 est lui aussi très finement régulé.

Monocotylédons

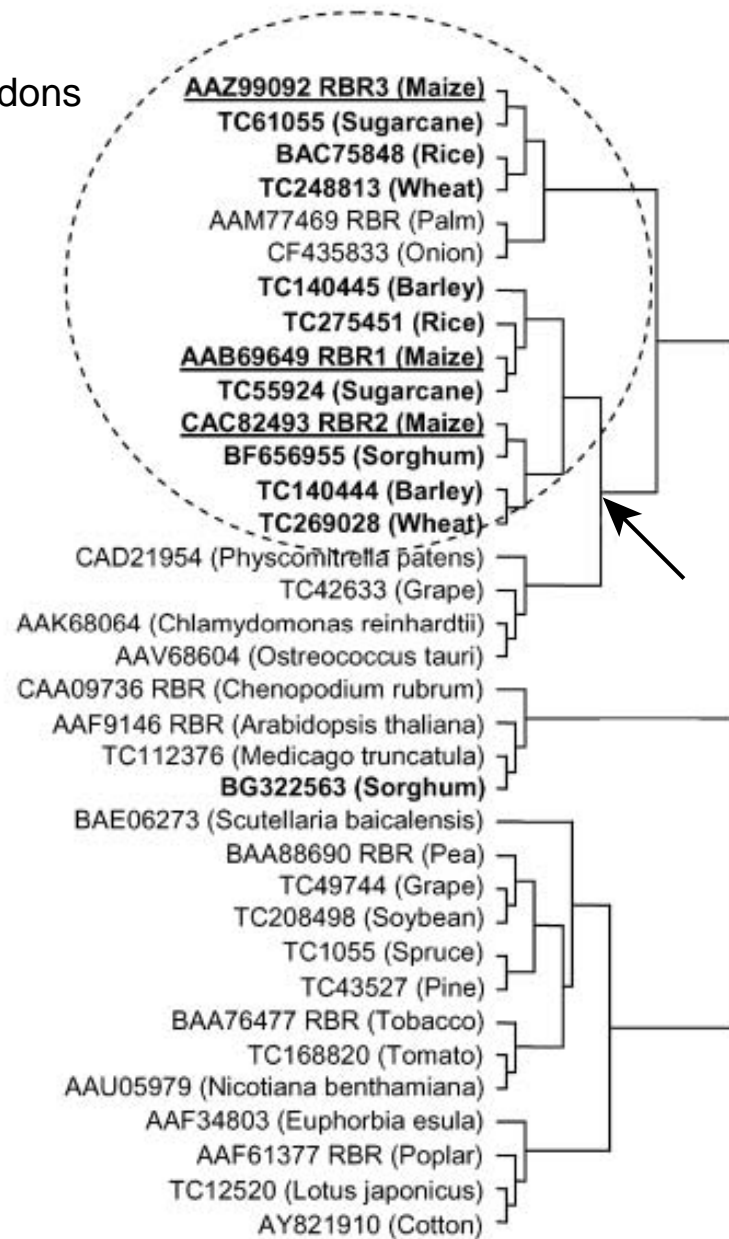


Figure 10: Arbre phylogénétique des protéines RB de plantes

La flèche indique l'évènement de duplication potentiel expliquant la présence de 2 protéines RB chez certaines espèces. Le groupe correspondant aux cotylédons est indiqué.

(D'après Sabelli and Larkins, 2006.)










Très peu d'informations sont disponibles au sujet de la régulation des protéines RB de plantes par d'éventuelles phosphatases. Le génome d'*Arabidopsis* contient 26 gènes codant pour des phosphatases de type sérine/thréonine (Farkas *et al.* 2007). D'autre part, une étude récente de double-hybride chez la levure a montré qu'une protéine RB de riz était capable de lier la phosphatase PP2B de la luzerne suggérant que le contrôle de RB par des phosphatases est conservé dans le règne végétal (Lendvai *et al.* 2007).

VI. Les protéines de la famille RB.

Chez les mammifères, outre RB, les protéines p107 et p130 appartiennent également à la famille des protéines à domaine « pocket » (Mulligan and Jacks 1998). Les gènes codant pour les protéines p107/p130 ont des séquences primaires relativement proches (de l'ordre de 50%) (Figure 7). L'identité entre p107/p130 et RB est globalement plus faible (30 et 35% respectivement). Cependant p107/p130 possèdent un domaine « pocket » constitué d'une boîte A et d'une boîte B assez similaire avec celui présent dans la protéine RB. La présence de ce domaine « pocket » conservé permet à ces protéines de s'associer aux facteurs E2F ainsi qu'aux protéines contenant un domaine LxCxE (Ewen *et al.* 1991, Li *et al.* 1993, Schwarz *et al.* 1993).

Tout comme RB, les protéines p107 et p130 ont la capacité de contrôler négativement le cycle cellulaire en fonction de leurs niveaux de phosphorylation (Claudio *et al.* 1994, Zhu *et al.* 1993, Mayol *et al.* 1995, Tedesco *et al.* 2002, Xiao *et al.* 1996). Ces protéines bloquent la transition entre les phases G1 et S en inactivant certains facteurs de transcription de la famille E2F dont le rôle est de faire entrer les cellules en phase S (Vairo *et al.* 1995, Zamanian and La Thangue 1993).

Dans le règne végétal, il existe une particularité assez intrigante. En effet, la fonction RB semble être assurée par deux protéines distinctes chez les monocotylédons tels que le riz, le blé, l'avoine et la canne à sucre (Sabelli and Larkins 2006). Le maïs possède même une troisième protéine homologue à RB (Lendvai *et al.* 2007) (Figure 10). Chez les mousses, les algues unicellulaires et les dicotylédons comme *Arabidopsis*, le tabac, le trèfle et la tomate, on trouve un seul et unique gène homologue à RB (Sabelli and Larkins 2006). Il semble donc que les monocotylédons aient développé un système de régulation du cycle cellulaire plus

		liaison à DP	liaison à la protéine "pocket"	répresseur	activateur
E2F1		+	Rb	-	++
E2F2		+	Rb	-	++
E2F3a		+	Rb	-	++
E2F3b		+	Rb	+/-	+/-
E2F4		+	Rb, p107, p130	++	+/-
E2F5		+	p107, p130	++	+/-
E2F6		-	-	++	-
E2F7		-	-	++	-
E2F8		-	-	++	-





 =NLS
  = domaine de liaison à ADN
  = domaine de dimérisation
 = domaine transactivateur

Figure 11: La famille E2F chez les mammifères.

La famille des facteurs E2F est divisée en 3 groupes selon leurs structures et leurs fonctions. Les interactions possibles avec des partenaires DP ainsi qu'avec la protéine "pocket" sont présentées dans le tableau. L'effet activateur et/ou répresseur de chaque facteur est indiqué.

(D'après Laquinta and Lees, 2007)

complexe que les dicotylédons. On peut supposer que comme chez les animaux, ces différentes protéines RB ont des rôles parfois chevauchants ou permettent une régulation plus fine du cycle cellulaire.

VII. Les facteurs E2F.

VII.1. Chez les mammifères.

Dans les cellules, les facteurs E2F sont présents sous la forme de complexes hétérodimeriques constitués d'une part du facteur E2F et d'autre part d'un facteur de transcription de type DP.

Les mammifères possèdent au moins 8 gènes codant pour 9 facteurs E2F différents (E2F1, E2F2, E2F3a, E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7 et E2F8) et on distingue 2 membres pour la famille des facteurs DP (DP1 et DP2) (Iaquinta and Lees 2007, Wu *et al.* 1995). Assez peu d'informations sont disponibles au sujet des propriétés spécifiques de chaque type de facteurs E2F. Cependant, certaines études suggèrent que chaque type de facteur pourrait avoir une fonction propre ou serait limité à certains types cellulaires (Field *et al.* 1996, Lindeman *et al.* 1998, Yamasaki *et al.* 1996). Les protéines E2F peuvent ainsi être classées en deux catégories en fonction de leurs propriétés transcriptionnelles (Figure 11). Les facteurs E2F1, E2F2 et E2F3a sont considérés comme des activateurs de transcription alors que les facteurs E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7 et E2F8 sont généralement classés dans la catégorie des répresseurs de transcriptions. Le gène E2F3 est à l'origine de la synthèse de deux transcrits via l'utilisation d'un promoteur alternatif situé dans un intron. Deux protéines sont ainsi produites : E2F3a, protéine pleine longueur et E2F3b, protéine qui a perdu son domaine transactivateur expliquant l'effet négatif de ce facteur lorsqu'il est présent au niveau d'un promoteur (He *et al.* 2000) (Figure 11).

Une protéine DP est toujours associée avec un des facteurs E2F afin de former un hétérodimère. Toutes les combinaisons sont possibles *in vivo* suggérant l'extrême complexité des voies de régulation transcriptionnelles contrôlées par les facteurs E2F (Iaquinta and Lees 2007).

VII.1.1) Les facteurs E2F1, E2F2 et E2F3a.

E2F1, E2F2 et E2F3a ont des structures fortement homologues en particulier au niveau des domaines de localisation nucléaire (NLS), de domaine de liaison à l'ADN, de domaine de dimérisation et d'association à une protéine à domaine « pocket » (Figure 11). Dans leurs régions carboxy-terminales on trouve également un domaine transactivateur conservé. E2F1, E2F2 et E2F3a sont considérés comme des activateurs transcriptionnels capables d'induire le passage en phase S d'une cellule bloquée en phase G1 (Lukas *et al.* 1996). Avec leurs partenaires DP, ils activent la transcription des gènes de réponse aux facteurs E2F (Krek *et al.* 1993).

VII.1.2) Les facteurs E2F3b, E2F4 et E2F5.

La séquence de ces protéines diverge beaucoup des facteurs E2F activateurs de transcription. Ces protéines ont en effet perdu la majeure partie de leur séquence amino-terminale (Figure 11). E2F3b, E2F4 et E2F5 possèdent cependant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de dimérisation et un domaine d'association à une protéine à domaine « pocket ». Plusieurs découvertes semblent indiquer que ces facteurs de transcription ont un effet négatif sur la régulation de l'expression des gènes E2F (Lukas *et al.*, 1996; He *et al.*, 2000)

VII.1.3) Les facteurs E2F6, E2F7 et E2F8

Il s'agit des facteurs les plus récemment caractérisés et de ce fait on ne dispose que de peu d'informations. Il semble qu'ils agissent en tant que répresseur de transcription en empêchant la fixation des facteurs E2F activateurs ou/et en recrutant des complexes répresseurs au niveau des promoteurs des gènes contrôlés par les facteurs E2F (Morkel *et al.* 1997; de Bruin *et al.* 2003, Maiti *et al.* 2005, Di Stefano *et al.* 2003, Trimarchi *et al.* 2001). Ils ne possèdent pas de site de dimérisation et de liaison aux protéines à domaine « pocket » et

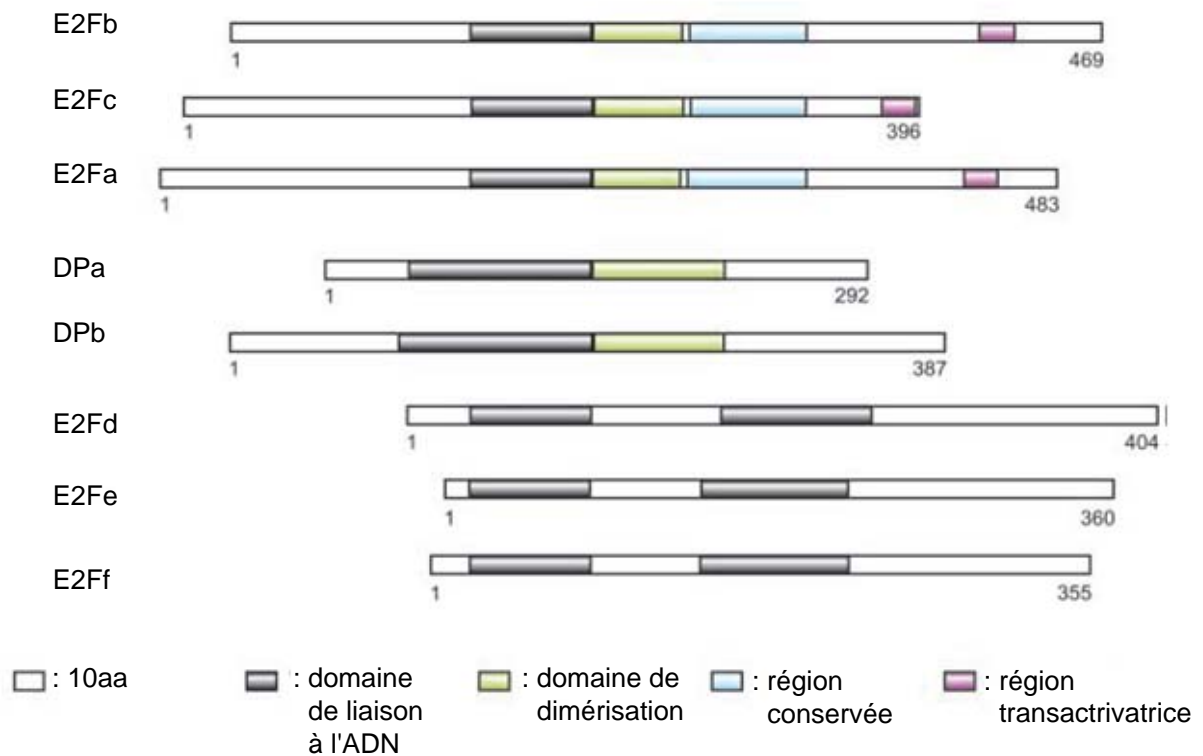


Figure 12: Les facteurs E2F chez *Arabidopsis thaliana*.

(D'après Vandepoele *et al*, 2002)

semblent donc agir indépendamment des facteurs DP et des protéines RB, p107 et p130 (Figure 11). (Di Stefano, Jensen and Helin 2003, Maiti *et al*, 2005, de Bruin *et al*, 2003).

VII.2. Chez les plantes.

Des facteurs E2F ont été identifiés chez de nombreuses espèces de plantes telles que le blé, la carotte, le tabac, le riz et *Arabidopsis thaliana* (Albani *et al*. 2000, Kosugi and Ohashi 2002, Mariconti *et al*. 2002, Ramirez-Parra *et al*, 1999, Sekine *et al*, 1999).

Chez *Arabidopsis*, on trouve 6 protéines homologues à E2F réparties en deux groupes distincts (Vandepoele *et al*. 2002) (Figure 12). Le premier groupe est constitué des facteurs de transcription E2F qui sont les plus similaires aux facteurs E2F de mammifères et sont désignés E2Fa, E2Fb et E2Fc. Ils possèdent un domaine de dimérisation, un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de liaison à RB et un domaine transactivateur (Figure 12). Comme pour les facteurs E2F humains E2F1-3, les facteurs E2Fa et b sont considérés comme des facteurs activateurs de transcription. En effet lorsqu'ils sont surexprimés, ils provoquent l'activation du cycle cellulaire ainsi que l'induction de l'expression de gènes spécifiques de la phase S (Magyar *et al*, 2005, Sozzani *et al*. 2006). Ces facteurs de transcription sont d'ailleurs capables d'interagir avec la protéine RB de plante (de Jager *et al*. 2001). E2Fa est exprimé tout le long du cycle cellulaire alors que E2Fb est principalement exprimé en fin de phase G1 et en début de phase S suggérant que ce facteur a un rôle important à jouer dans le contrôle du passage du point de restriction R chez les plantes (De Veylder *et al*, 2002). Le facteur E2Fa est fortement exprimé dans les tissus vasculaires des feuilles et des racines ainsi que dans des régions de forte division cellulaire telles que la pointe des racines, le méristème apical et le primordium foliaire (De Veylder *et al*, 2002). Le facteur E2Fc est considéré comme un répresseur de transcription (Sozzani *et al*, 2006). En effet, des expériences d'expression transitoire ont montré que le facteur E2Fc ne possédait pas de propriétés d'activateur de transcription (Kosugi and Ohashi 2002). Pourtant E2Fc est capable d'interagir avec la protéine RB (del Pozo *et al*. 2002). La taille réduite de son domaine transactivateur en C terminal serait la cause de son incapacité à activer la transcription de manière efficace (Kosugi and Ohashi 2002) (Figure 12). Ainsi, lorsque E2Fc est surexprimé, il provoque un retard de la division cellulaire ainsi qu'une inhibition des gènes spécifiques de la phase S (del

Pozo, Boniotti and Gutierrez 2002). Cependant, la fonction d'inhibiteur de transcription d'E2Fc n'est pas complètement établie. En effet, il a été montré capable de transactiver l'expression de gènes rapporteurs dotés de promoteurs possédant des sites de liaisons aux facteurs E2F (Mariconti *et al*, 2002). D'autre part, le facteur E2Fc est exprimé principalement au niveau des méristèmes et des cellules récemment différenciées (del Pozo, Boniotti and Gutierrez 2002). Il semblerait donc que, comme chez les mammifères, les différentes activités des facteurs E2F (activatrices et/ou répressives) pourraient dépendre du type de cellule ainsi que du stade de développement.

La seconde catégorie de facteur E2F chez *Arabidopsis* regroupe les facteurs E2Fd, E2Fe, and E2Ff. Ces facteurs ont la particularité de ne pas posséder de domaine de liaison à RB, de domaine transactivateur ni même de domaine de dimérisation (Figure 12). Par contre, ils possèdent deux domaines de liaison à l'ADN ce qui leur permet de reconnaître un site E2F indépendamment de la présence d'un facteur DP tout comme leurs homologues mammifères E2F7 et E2F8 (Mariconti *et al*, 2002, Di Stefano, Jensen and Helin 2003, Maiti *et al*, 2005). Cependant même si la présence d'un motif NLS leur permet d'être présents dans le noyau, l'absence de domaine transactivateur ne leur permet pas d'activer la transcription, au contraire, ils semblent capables d'interférer avec l'activité des autres membres de la famille E2F probablement en rentrant en compétition pour le même site cible de l'ADN (Mariconti *et al*, 2002, Kosugi and Ohashi 2002). Ainsi la surexpression de E2Fd conduit à une diminution de la taille des cellules des racines et de l'hypocotyle, en réprimant des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse de la paroi des cellules (Ramirez-Parra *et al*. 2004). E2Fd et E2Ff sont d'ailleurs peu exprimés au cours de la phase S suggérant leur rôle antagoniste sur le contrôle des gènes E2F en dehors de cette phase (Mariconti *et al*, 2002).

VIII. Les facteurs DP

Chez les mammifères on trouve 2 gènes DP codant pour les protéines DP1 et DP2 (Girling *et al*. 1993, Wu *et al*. 1995). Les facteurs DP et E2F possèdent le même domaine de liaison à l'ADN et reconnaissent la même séquence ADN (Girling *et al*. 1993). Cependant, les facteurs DP1 et DP2 ne sont pas capables de lier l'ADN en l'absence d'un facteur E2F (Zhang and Chellappan 1995). Le complexe E2F/DP active la transcription de manière synergique.

Cycle cellulaire	Synthèse et réplication de l'ADN	Régulateurs négatifs du cycle cellulaire	Apoptose
G1	ASK	CDKN1C	APAF1
CCND1	CDC14B	CDKN2C	BAD
CCND2	CDC45L	CDKN2D	BAK1
JUN	CDC6	E2F7	BCL2
MYC	CDC7L1	RB1	BID
MYCN	CDT1	RBL1	BOK
G1/S	DCK	Checkpoints	CASP3
CCNE1	DHFR	BRCA1	CASP7
CCNE2	DUT	BRCA2	CASP8
CDC25A	LIG1	BUB1	MAP3K14
CDK2	MCM2	BUB1B	MAP3K5
E2F1	MCM3	BUB3	TP73
E2F2	MCM4	CENPE	Développement
E2F3	MCM5	CHK1	BAPX1
NPAT	MCM6	MAD2L1	EED
MYB	MCM7	TP53	EN2
MYBL2	ORC1L	TTK	EZH2
TFDP1	PCNA	Réparation de l'ADN	FOS
S/G2	POLA	BARD1	HEY1
AURKB	POLA2	CSTF1	HOXA4
CCNA1	POLD1	FEN1	HOXA5
CCNA2	PRIM2A	MGMT	HOXA7
CDC2	RCF1	MLH1	HOXA9
CDC20	RCF2	MSH2	HOXA10
CKS1	RCF3	MSH6	HOXA11
CKS2	RCF4	PMS2	HOXB9
HEC	RPA1	PRKDC	HOXD8
KI-67	RPA2	RAD51	PITX1
KIF4A	RPA3	RAD54L	SIX1
KNSL4	RRM1	UNG1	SUZ12
PLK	RRM2	UNG2	Différentiation
PRC1	TK1		BMP2
SMC2L1	TOP2A		FST
SMC4L1	TYMS		TGFA
STK12			PPARGC1
			JUNB
			TEAD4

Figure 13: Gènes contrôlés par les facteurs E2F chez les mammifères

Exemples de gènes cibles de E2F regroupés en fonction de leurs rôle dans la cellule. Ces gènes ont été mis en évidence par des techniques de micro array et/ou par des techniques classiques. (Voir Bracken *et al*, 2004 pour plus de détails).

Ainsi le facteur DP active la transcription en augmentant l'activité transcriptionnelle et la capacité de liaison à l'ADN du facteur E2F qui lui est associé (Bandara *et al.* 1993, Helin *et al.* 1993, Krek, Livingston and Shirodkar 1993).

Chez *Arabidopsis*, on trouve 2 facteurs DP désignés DPa et DPb lesquels possèdent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de dimérisation comme leurs homologues mammifères DP1 et DP2 (Kosugi and Ohashi 2002, Magyar *et al.* 2000) (Figure 12). E2Fa et E2Fb sont capables d'interagir à la fois avec DPa et DPb alors que E2Fc n'interagit qu'avec le facteur DPb (del Pozo, Boniotti and Gutierrez 2002, del Pozo *et al.* 2006, Magyar *et al.* 2000). Les facteurs E2Fa, E2Fb et E2Fc ne sont pas capables de s'associer directement à l'ADN, en effet pour cela, ils ont besoin d'être associés sous forme dimérique avec un facteur DP (Kosugi and Ohashi 2002, Mariconti *et al.* 2002). Les facteurs DPa et DPb possèdent un NLS dans leur région amino-terminal. La présence de ce NLS est essentielle dans la fonction de localisation de ces facteurs. En effet DPa va permettre la localisation des facteurs E2Fa et E2Fb au niveau du noyau de la cellule (Kosugi and Ohashi 2002). Même si DPb semble être le partenaire du facteur E2Fc, il ne permet pas de le localiser au niveau du noyau suggérant que l'adressage du facteur E2Fc passe par d'autres types d'interaction (Kosugi and Ohashi 2002). Comme pour E2Fa, la transcription du facteur DPa varie au cours du cycle cellulaire, l'accumulation de ces deux transcrits est en effet maximale au début de phase S (Magyar *et al.*, 2000) Il semble que comme pour les mammifères, les facteurs E2F et DP de plantes s'associent sous la forme d'hétérodimères afin de venir moduler l'expression des gènes de réponses aux facteurs E2F.

IX. Les gènes contrôlés par les facteurs E2F.

IX.1. Les gènes identifiés chez les mammifères.

Les facteurs de transcription de la famille E2F sont des effecteurs de la protéine RB et vont contrôler l'expression de plusieurs centaines de gènes intervenant non seulement dans la réplication de l'ADN et le cycle cellulaire mais aussi dans la réparation de l'ADN, l'apoptose, la différenciation et le développement (Bracken *et al.* 2004) (Figure 13).

Les facteurs E2F se lient aux promoteurs au niveau d'une séquence consensus de type TTTCGCGC (Hardy and Shenk 1989). Cette séquence est présente dans les promoteurs de

Catégorie de gène	Description du gène	Locus chez Arabidopsis
Facteurs d'origine de réplication		
	DNA replication licensing factor CDC6a	At2g29680
	Origin recognition complex subunit 1 (ORC1)	At4g12620
	Origin recognition complex subunit 3 (ORC3)	At5g16690
	Minichromosome maintenance family protein (MCM)	At2g14050
	Origin recognition complex subunit 6 (ORC6)	At1g26840
	Minichromosome maintenance family protein (MCM)	At1g44900
	Minichromosome maintenance family protein (MCM)	At2g16440
	Minichromosome maintenance family protein (MCM)	At3g09660
	CDT1a	At2g31270
	DNA replication licensing factor CDC6b	At1g07270
	Cell division control protein 45 (CDC45)	At3g25100
Structure de la Chromatine		
	High mobility group protein (HMGB7)	At5g23420
	Structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein	At5g07660
	SET domain-containing protein (SDG27)	At5g24330
	Arabidopsis homolog-pairing 2 (AHP2)	At1g13330
	Structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein	At5g61460
	Chromatin assembly factor-1 (FAS1)	At1g65470
	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase (DMT1)	At5g49160
	Histone acetyltransferase (HAG2)	At5g56740
	Sister chromatid cohesion 1 protein (RAD21-2)	At3g59550
	Trithorax-like protein 1 (SDG27)	At2g31650
	Antisilencing factor 1-related protein (SGA1)	At5g38110
	DNA-dependent ATPase (CHR10)	At2g44980
	SMC2-like condensin (CPE1)	At5g62410
	Chromomethylase 3 (DMT6)	At1g69770
	DNA-dependent ATPase (CHR17)	At5g18620
	Antisilencing factor 1-related protein (SGA2)	At1g66740
Réparation de l'ADN		
	Uracil DNA glycosylase family protein	At3g18630
	DNA mismatch repair protein (MSH6-1)	At4g02070
	RAD1-like protein	At4g17760
	DNA mismatch repair protein (PMS2)	At4g02460
	6-4 Photolyase (UVR3)	At3g15620
	Cell cycle checkpoint protein (RAD17)	At5g66130
	DNA mismatch repair MutS family (MSH1)	At3g24320
	UMUC-like DNA repair protein	At5g44740
	DNA repair protein (RAD5)	At5g22750
	DNA mismatch repair protein (MSH3)	At4g25540
	DNA nick sensor	At3g14890
	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	At2g41460

Catégorie de gène	Description du gène	Locus chez Arabidopsis
Cycle cellulaire		
	Retinoblastoma-related protein (RBR1)	At3g12280
	DP-E2F-related protein (DEL3)	At3g01330
Enzymes de Réplication		
	Helicase-related protein	At1g20750
	DEAD/DEAH box helicase	At1g35530
	DNA helicase	At3g05740
	DNA topoisomerase III	At5g63920
	Ribonucleoside-diphosphate reductase (RNR) small subunit	At3g27060
	DNA primase large subunit	At1g67320
	DNA polymerase -subunit B	At1g67630
	DNA polymerase III catalytic subunit	At5g63960
	DNA primase small subunit	At5g41880
	DNA polymerase	At5g67100
	Ribonucleoside-diphosphate reductase (RNR) large subunit	At2g21790
	Helicase-related protein	At1g20720
	DNA replication protein-related	At5g49010
	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	At3g46940
	Helicase-related protein	At1g79890
	Replication protein A-like	At2g24490
	Proliferating cell nuclear antigen 2 (PCNA2)	At2g29570
	Proliferating cell nuclear antigen 1 (PCNA1)	At1g07370
	DNA polymerase small subunit-related	At2g42120
	DNA ligase	At1g08130
	Replication protein A-like	At3g02920
	DNA polymerase catalytic subunit	At1g67500
	DNA gyrase subunit A	At3g10690
	Putative replication factor C	At5g27740

Figure 14: Les gènes cibles des facteurs E2F chez *Arabidopsis*.

Exemples de gènes cibles de E2F regroupés en fonction de leurs rôles dans la cellule. Ces gènes ont été mis en évidence par des techniques de micro array et/ou par des techniques classiques. Le locus du gène est indiqué. Des homologues de ces gènes ont été mis en évidence chez le riz, la grande majorité ont conservé un motif de liaison aux facteurs E2F. (Voir Vandepoele *et al*, 2005 pour plus de détails).

nombreux gènes connus ou supposés avoir un rôle dans la croissance cellulaire et le contrôle du cycle cellulaire (Figure 13). Ainsi, les facteurs E2F contrôlent l'expression du facteur b-myb responsable de la régulation de l'expression de nombreux gènes intervenant dans la phase S (Joaquin and Watson 2003, Lam and Watson 1993). Ils contrôlent également l'expression du facteur de transcription c-myc important dans la croissance cellulaire (Hiebert *et al.* 1989, Thalmeier *et al.* 1989).

Les facteurs E2F régulent l'expression de gènes codant à la fois des enzymes intervenant dans la synthèse des nucléotides telles que la thymidine kinase, la thymidilate synthase, la dihydrofolate réductase, et les protéines qui composent le complexe de reconnaissance de l'origine de réplication tel que Orc1, CDC6 et MCM2 à MCM7 (Leone *et al.* 1998, Yan *et al.* 1998). Des gènes codant pour la machinerie de réplication comme les sous-unités I et II de l'ADN polymérase alpha, le cofacteur PCNA des polymérases et la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase delta sont également sous contrôle des facteurs E2F (Lee *et al.* 1995, Pearson *et al.* 1991, Zhao and Chang 1997).

Il est enfin intéressant de noter que les promoteurs des gènes E2F sont eux-mêmes contrôlés par les facteurs E2F (Ren *et al.* 2002).

IX.2. Les gènes identifiés chez les plantes.

Chez *Arabidopsis*, on trouve plus de 3500 gènes contenant un motif de liaison aux facteurs E2F de 12 pb de long (séquence consensus nTTssCGssAAAn, n étant un A ou T et s un G ou un C) au niveau de leurs promoteurs (Vandepoele *et al.* 2005). Le contrôle de la transcription des gènes par les facteurs E2F chez les plantes a été mis en évidence pour un nombre limité de gènes (Figure 14). Ainsi, il a été montré que le gène RNR (RiboNucléotide Réductase) et PCNA du tabac ainsi que le gène CDC6 d'*Arabidopsis* était sous le contrôle de ces facteurs de transcription (Castellano *et al.* 2001, Chaboute *et al.* 2000, de Jager *et al.* 2001).

Plus récemment, des études bioinformatiques associées à des analyse par RT-PCR et de microarray chez *Arabidopsis* ont permis de mettre en évidence l'importance et la diversité des gènes contrôlés par les facteurs E2F au cours du cycle cellulaire (Ramirez-Parra *et al.* 2003, Vandepoele, *et al.* 2005) (Figure 14). Ainsi chez les plantes, les facteurs E2F contrôlent

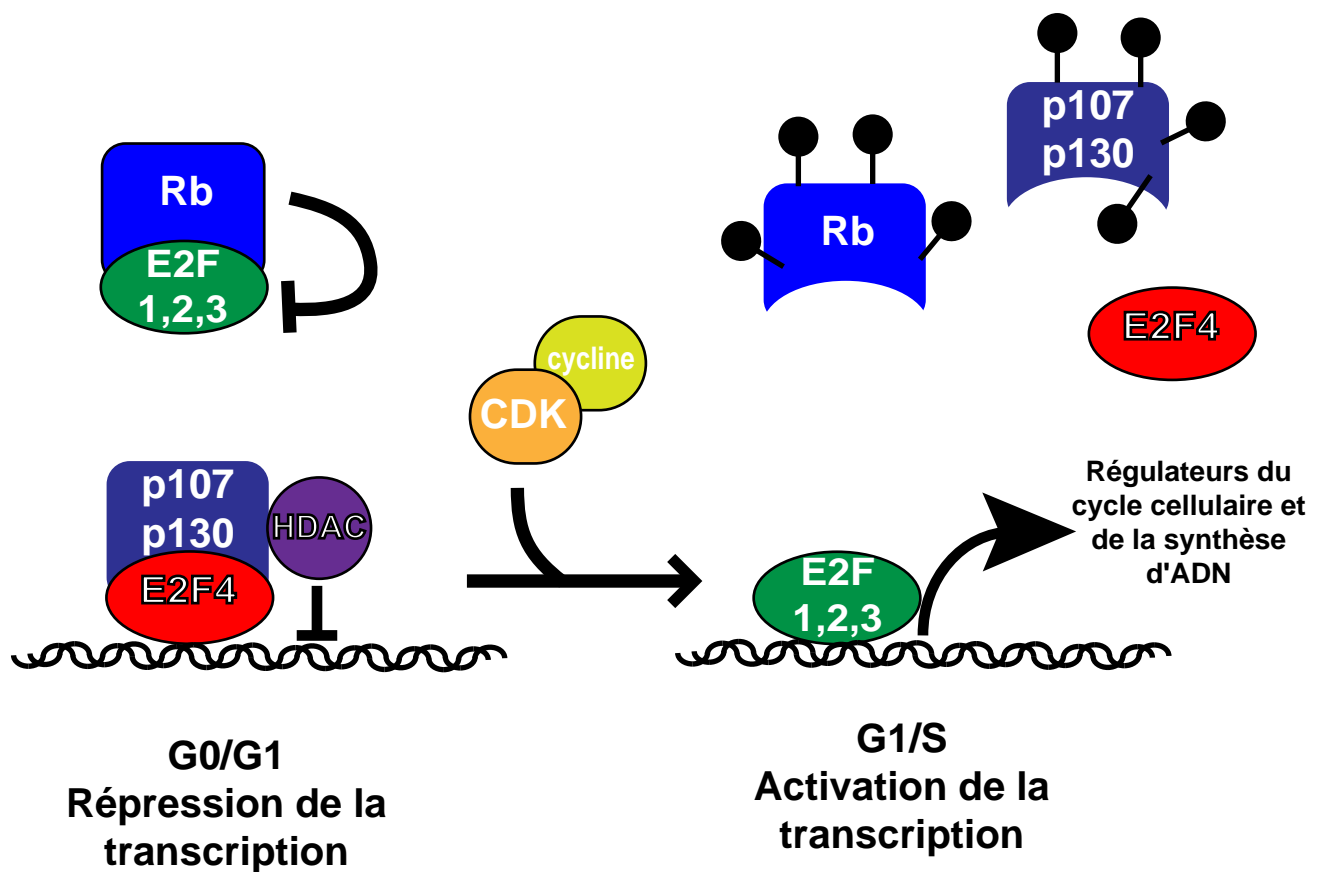


Figure 15: Régulation de la transcription des gènes cibles de E2F au cours du cycle cellulaire chez les mammifères.

la transcription de certains éléments clés du cycle cellulaire tels que la protéine RB, la cycline CYCA3;2 et les facteurs E2Fb, c et f. Ils jouent également un rôle dans le contrôle de nombreux éléments assurant la réplication de l'ADN comme l'ADN topoisomérase III, le domaine catalitique α de l'ADN polymérase III, les gènes codant pour les protéines PCNA1 et 2 et l'ADN polymerase δ .

Des facteurs contrôlant l'initiation de la réplication sont également régulés par les facteurs E2F, c'est le cas des gènes CDC6 a et b, des protéines de reconnaissance des origines de réplication ORC 1, 3 et 6 (Origin recognition complex) et des protéines MCM (Minichromosome maintenance). Certains gènes intervenant dans la structure de la chromatine sont aussi soumis au contrôle des facteurs E2F chez *Arabidopsis*, c'est le cas de l'ADN méthyl transférase DMT1 et des histones acétyltransférases HAG2 et HAT1.

Enfin, des gènes intervenant dans les processus de réparation de l'ADN sont également contrôlés par ces facteurs de transcription tel que les protéines MSH1 et 3 (mismatch repair homologue of MutS family), RAD5 et BRCA2.

Des gènes normalement activés au cours de la phase G2 du cycle cellulaire sont également contrôlés par les facteurs E2F. C'est par exemple le cas des gènes codant pour les cyclines CYCA2;2 et CYCB1;1 qui sont des gènes spécifiques des phases G2-M du cycle cellulaire (Hemerly *et al.* 1992). Cependant, parmi tout les gènes cibles potentiels des facteurs E2F, la grande majorité est exprimée au cours des phases G1-S ce qui met bien en évidence le rôle spécifique de ces facteurs dans cette phase précise du cycle cellulaire chez les plantes.

X. Contrôle des facteurs E2F par la protéine RB au cours du cycle cellulaire.

X.1. Chez les mammifères.

En phase G0 et au début de la phase G1 les promoteurs des gènes de réponse aux facteurs E2F sont réprimés. En effet, durant ces stades du cycle cellulaire, les facteurs répresseurs de transcription E2F4 et E2F5 sont fixés sous la forme d'hétérotrimère avec une protéine DP au niveau des promoteurs des gènes E2F (Takahashi *et al.* 2000) (Figure 15). Les protéines p107 et p130 sont alors associées à ces deux facteurs E2F *via* leurs domaines

« pocket » (Cao *et al.* 1992, Cobrinik *et al.* 1993, Shirodkar *et al.* 1992). Le complexe p107/p130 réprime également l'activité des gènes en recrutant une histone déacétylase HDAC1 laquelle déacétyle les histones H4 situées au niveau du promoteur du gène (Ferreira *et al.* 1998, Ferreira *et al.* 2001). D'autres enzymes de remodelage de la chromatine interviendraient dans l'effet répresseur des protéines p107 et p130 notamment l'ADN méthyl transférase DNMT1 et l'histone méthyl transférase SUV39H1 (Macaluso *et al.* 2003). Parallèlement, la protéine RB hypophosphorylée séquestre les facteurs activateurs de transcription E2F1, E2F2 et E2F3 lesquels ne peuvent pas se fixer au niveau des promoteurs des gènes contrôlés par les facteurs E2F (de la Luna *et al.* 1996).

La protéine RB semble également intervenir dans la répression de certains gènes contrôlés par les facteurs E2F lors des phases G0 et G1. Par exemple, le promoteur du gène codant pour la cycline E est dérégulé dans des cellules mutées pour RB et cela même en présence de complexe p107/p130/E2F4 disponibles (Herrera *et al.* 1996). RB réprimerait la transcription en recrutant une histone déacétylase, une histone méthyl transférase, une ADN méthyl transférase et/ou les facteurs SWI/SNF de remodelage des nucléosomes (Brehm *et al.* 1998, Dunaief *et al.* 1994, Magnaghi-Jaulin *et al.* 1998, Robertson *et al.* 2000, Vandel *et al.* 2001). Il est intéressant de noter que l'absence des facteurs E2F1, E2F2 et E2F3 conduit également à la dérégulation du promoteur du gène codant pour la cycline E (Wu *et al.* 2001). Ainsi les facteurs E2F1-3 semblent avoir un rôle répresseur de transcription dans certaines conditions. Ce dernier exemple illustre bien la complexité de la régulation des gènes par les facteurs E2F et par les protéines à domaine « pocket ».

A la fin de la phase G1, la protéine RB est phosphorylée par les complexes cyclines/CDK ce qui entraîne la libération des facteurs E2F1, E2F2 et E2F3. De la même manière, les protéines p130 et p107 sont également la cible de kinases (De Luca *et al.* 1997) (Figure 15). Ils se dissocient des facteurs répresseurs E2F4 et E2F5 lesquels vont être transférés dans le cytoplasme et dégradés par le protéasome (Hateboer *et al.* 1996). Les facteurs E2F1, E2F2 et E2F3 libres vont alors pouvoir se fixer au niveau des promoteurs sous la forme d'hétérodimère avec un facteur DP et ainsi activer la transcription (Takahashi, Rayman and Dynlacht 2000). Cette fixation se fait le plus souvent au niveau de sites différents de ceux utilisés par les facteurs E2F répresseurs (Araki *et al.* 2003).

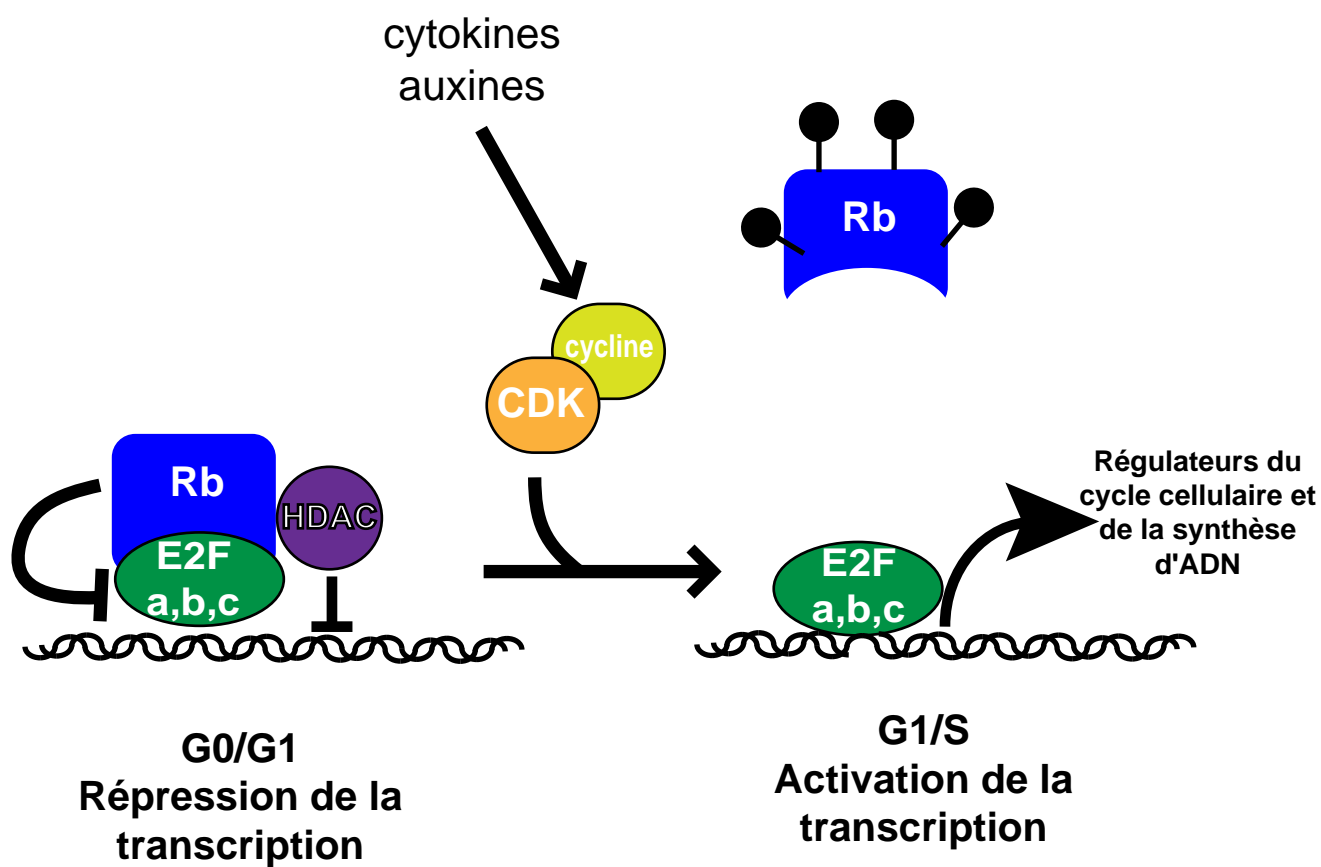


Figure 16: Régulation de la transcription des gènes cibles de E2F au cours du cycle cellulaire chez *Arabidopsis thaliana*.

E2F1, E2F2 et E2F3 sont des facteurs activateurs de transcription qui contrôlent l'activation des gènes de réponses aux facteurs E2F. En effet la surexpression de l'un de ces facteurs conduit une cellule quiescente à ré-entrer dans le cycle cellulaire (Lukas *et al.* 1996). Ainsi, à chaque cycle cellulaire, les facteurs E2F induisent l'activation de gènes intervenant dans la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire.

Même si les protéines RB, p107 et p130 semblent avoir des rôles distincts au cours du processus de régulation de l'expression des gènes E2F, leurs rôles dans le contrôle du cycle cellulaire peuvent aussi être redondant dans certains cas. Ainsi des fibroblastes mutants pour la protéine RB ou pour le complexe p107/p130 sont toujours capable de bloquer le cycle cellulaire en G0/G1 alors que la perte de l'ensemble de ces protéines à domaine « pocket » ne permet plus de stopper la progression du cycle cellulaire (Dannenberg *et al.* 2000, Sage *et al.* 2000).

L'ensemble des protéines à domaine « pocket » pourraient réguler l'activité transcriptionnelle de manière différente en fonction du stade du cycle cellulaire, du promoteur ou du type cellulaire et cela en recrutant un facteur E2F particulier.

X.2. Contrôle des facteurs E2F par RB chez les plantes

On dispose de peu d'informations concernant le déroulement du processus de contrôle des gènes E2F par la protéine RB au cours du cycle cellulaire. Lors de la phase G0, il est probable que comme chez les mammifères, les facteurs E2F soient inactifs car associés avec la protéine RB (Figure 16). Parallèlement, la présence de RB au niveau des promoteurs des gènes permet probablement de mettre en place un état réprimé de la chromatine comme ce que l'on observe chez les mammifères. En effet, le génome d'*Arabidopsis* encode plusieurs protéines appartenant aux protéines de remodelage des nucléosomes SWI-SNF. L'une d'entre-elle, la protéine SYD, présente d'ailleurs un motif de liaison à la protéine RB suggérant que des complexes de types SWI-SNF pourraient jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes contrôlés par les facteurs E2F (Wagner and Meyerowitz 2002). Chez les mammifères, le recrutement des histones déacétylase HDAC par la protéine RB se fait via

l'intermédiaire de la protéine RbAp48 qui appartient à un complexe de remodelage de la chromatine (Parthun *et al.* 1996, Qian *et al.* 1993). Des homologues de RbAp48 ont été identifiés chez la tomate et chez *Arabidopsis* (Ach *et al.* 1997). L'homologue présent chez la tomate est d'ailleurs capable de s'associer avec la protéine RB du maïs (Ach, Taranto and Gruissem 1997). Cela suggère que comme chez les mammifères, la protéine RB, lorsqu'elle est associée au niveau d'un promoteur, est capable d'inhiber la transcription en modifiant l'état de la chromatine via des histones déacétylases. D'autre part, chez les mammifères, l'ADN méthyl transférase DNMT1 est associé avec les HDAC au niveau des promoteurs. La conservation de la protéine DNMT1 chez *Arabidopsis* suggère que cette dernière est également présente au niveau des promoteurs des gènes associée à RB afin de méthyliser l'ADN (2000). Il est aussi probable que la protéine RB des plantes soit capable de recruter des histone méthyl transférases (HMT) comme ses homologues mammifères. En effet la protéine CLF (Curly LeaF) d'*Arabidopsis* possède un domaine caractéristique des HMT et est capable de s'associer avec la protéine RB de maïs et humaine (Williams and Grafi 2000).

Chez les plantes, l'activation du cycle cellulaire passerait par les cyclines de type D, en particulier la cycline CYCD3;1 dont la transcription est contrôlée en réponse aux hormones de type cytokinines et auxines permettant ainsi d'intégrer des signaux provenant de l'environnement extérieur (Riou-Khamlichi, Huntley, Jacquemard and Murray 1999) (Figure 16). Cette cycline interagit avec la kinase CDKA (Healy *et al.* 2001). L'interaction entre les deux protéines active l'activité kinase de CDKA, laquelle va venir phosphoryler la protéine RB grâce à la présence d'un domaine LxCxE de liaison à RB porté sur la cycline de type D (Nakagami *et al.* 1999). RB sous sa forme phosphorylée libère les facteurs de transcription E2Fa-c. Ces facteurs de transcription vont alors former un hétérodimère avec un de leur partenaire DP et ainsi se fixer au niveau de sites de liaison aux facteurs E2F situés au niveau des promoteurs et ainsi activer ou réprimer leur activation qui conduit alors au passage de la phase G1 à la phase S (Figure 16).

XI. Rôle de RB dans le contrôle de la croissance cellulaire

Parallèlement au contrôle du cycle cellulaire, la protéine RB régule aussi la croissance cellulaire laquelle nécessite la présence d'ARN de transfert (ARNt) et d'ARN ribosomiques (ARNr) en grande quantité. Ainsi, les facteurs E2F ne sont pas les seuls facteurs de transcription contrôlés par la protéine RB. RB est en effet capable d'agir sur les facteurs de transcription UBF (Upstream Binding Factor) et TFIIB/TFIIC2 lesquels contrôlent respectivement la transcription par l'ARN polymérase I (pol I) et III (pol III) responsables de la synthèse des ARNr et ARNt (Cavanaugh *et al.* 1995, White *et al.* 1995). L'activité des pol I et pol III est d'ailleurs augmentée au cours du passage entre les phases G1 et S, période pendant laquelle la protéine RB est hyperphosphorylée et donc inactivée (Klein and Grummt 1999, White *et al.* 1995).

A ce jour, aucune étude n'a évoqué un lien éventuel entre la fonction RB et le contrôle de la croissance cellulaire chez les plantes où les machineries de transcription pol I et pol III sont d'ailleurs assez peu connues.

XI.1. Contrôle de l'activité de l'ARN polymérase I.

L'ARN polymérase I est responsable de la transcription des ARNr à l'exception de l'ARNr 5S. Chez l'homme, cette polymérase permet la transcription du gène codant pour l'ARN 45S, précurseur des ARNr 28S, 5.8S et 18S. La formation du complexe d'initiation de la pol I nécessite l'association de deux facteurs au niveau du promoteur: les facteurs SL-1 et UBF (Bell *et al.* 1988, Learned *et al.* 1986).

Des expériences de transcription *in vitro* ont montré que la protéine RB est capable de réguler la transcription pol I en inhibant l'activité du facteur de transcription UBF (Cavanaugh *et al.* 1995). Pour permettre l'initiation de la transcription, le facteur UBF doit interagir à la fois avec le promoteur du gène 45S mais aussi avec le facteur SL-1. SL-1 est un complexe constitué de la protéine TBP (TATA-Binding Protein) et d'au moins 3 facteurs TAF (TBP associated factors)(Comai *et al.* 1992). Il semble que l'interaction de RB avec le facteur UBF empêche l'activation de la transcription non pas en empêchant la fixation de

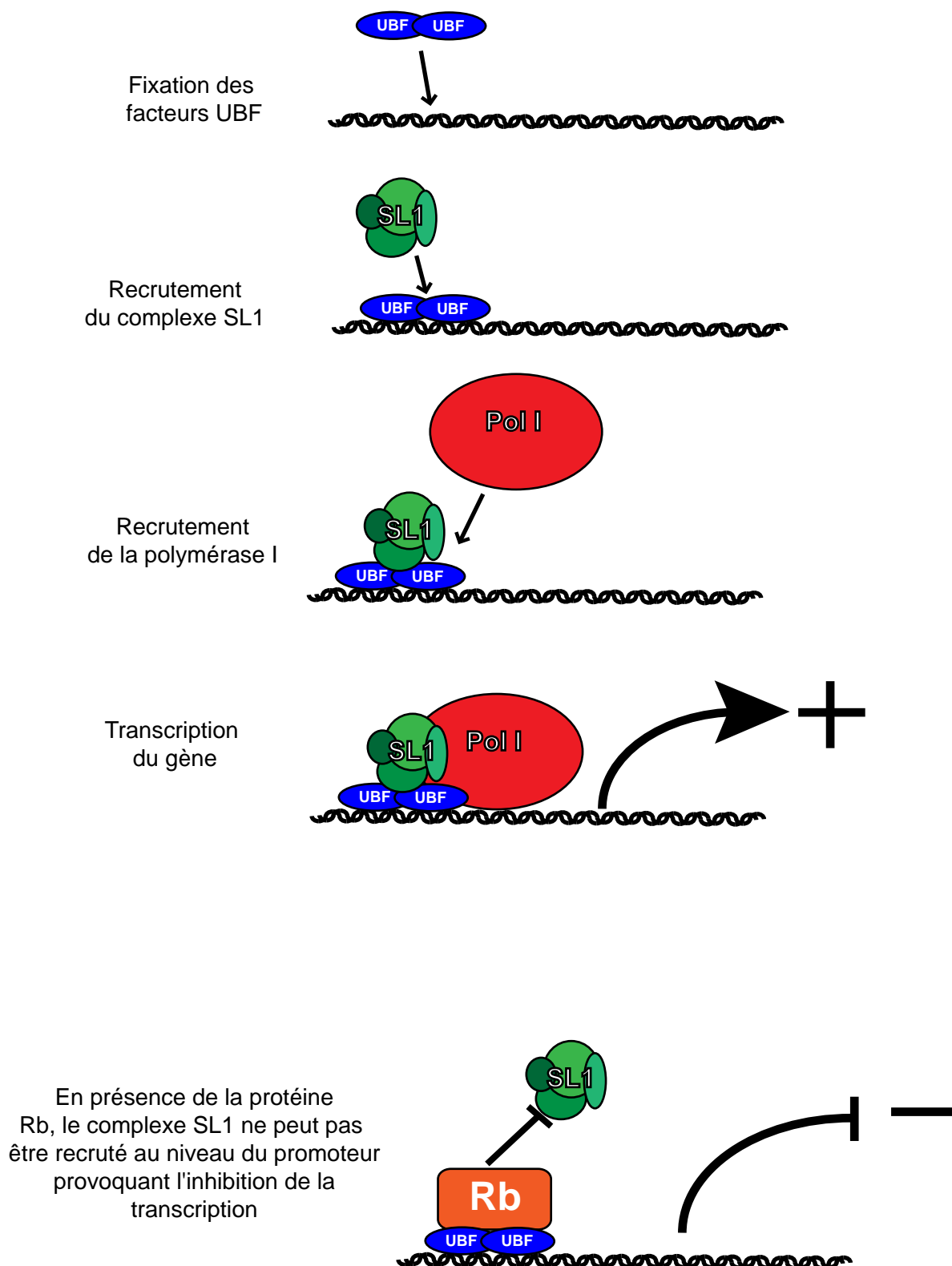


Figure 17: La transcription pol I et sa répression par Rb.

UBF sur le promoteur mais en empêchant le recrutement du facteur SL-1 (Hannan *et al.* 2000) (Figure 17).

Contrairement à la protéine p107, p130 peut elle aussi interagir avec le facteur UBF afin d'inhiber la transcription par la pol I (Ciarmatori *et al.* 2001, Hannan *et al.* 2000).

Chez les plantes, l'ARN polymérase I est responsable de la transcription des ARN ribosomiques 18S, 25S et 5.8S nécessaires à la traduction laquelle est très active au cours de la croissance cellulaire. Or la transcription dirigée par la pol I est activée dans les cellules en croissance et réprimée dans les cellules quiescentes. Cela suggère qu'un mécanisme de contrôle permettant de faire le lien entre l'état cellulaire et la demande en ARN ribosomiques est conservé chez les plantes. D'après les banques de données, il existe un homologue au facteur UBF chez *Arabidopsis*. Ce gène présent au niveau du locus AT4G23800 encode une protéine qui a conservé un motif de liaison potentiel au domaine « pocket » de la protéine RB. Il est donc envisageable que la protéine RB des plantes soit capable d'interférer avec l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I. D'autre part il est intéressant de noter que la cytokine induit la transcription pol I chez *Arabidopsis* (Gaudino and Pikaard 1997). Or nous avons vu que cette hormone végétale était aussi capable d'intervenir sur la phosphorylation de la protéine RB (Boniotti and Gutierrez 2001). Il est serait intéressant de voir si un lien entre les deux est envisageable.

XI.2. Contrôle de l'activité de l'ARN polymérase III.

Chez l'homme, l'ARN polymérase III est responsable de la transcription de petits ARN fonctionnels nécessaires à la traduction tel les l'ARNt et l'ARN ribosomique 5S. Elle permet aussi la transcription des ARN U6 et H1 qui jouent un rôle dans le mécanisme de maturation des ARN. La pol III assure également la transcription du gène 7SL qui intervient dans la machinerie de transport des protéines vers la lumière du réticulum endoplasmique. Enfin, la pol III est responsable de la transcription des éléments SINE. Les promoteurs des gènes transcrits par la pol III sont de trois types. Le promoteur de type I est spécifique aux gènes des ARNr 5S. Le promoteur de type II est présent au niveau des gènes codant les ARNt, les gènes VA de l'adénovirus et de certains éléments transposables comme les SINE.

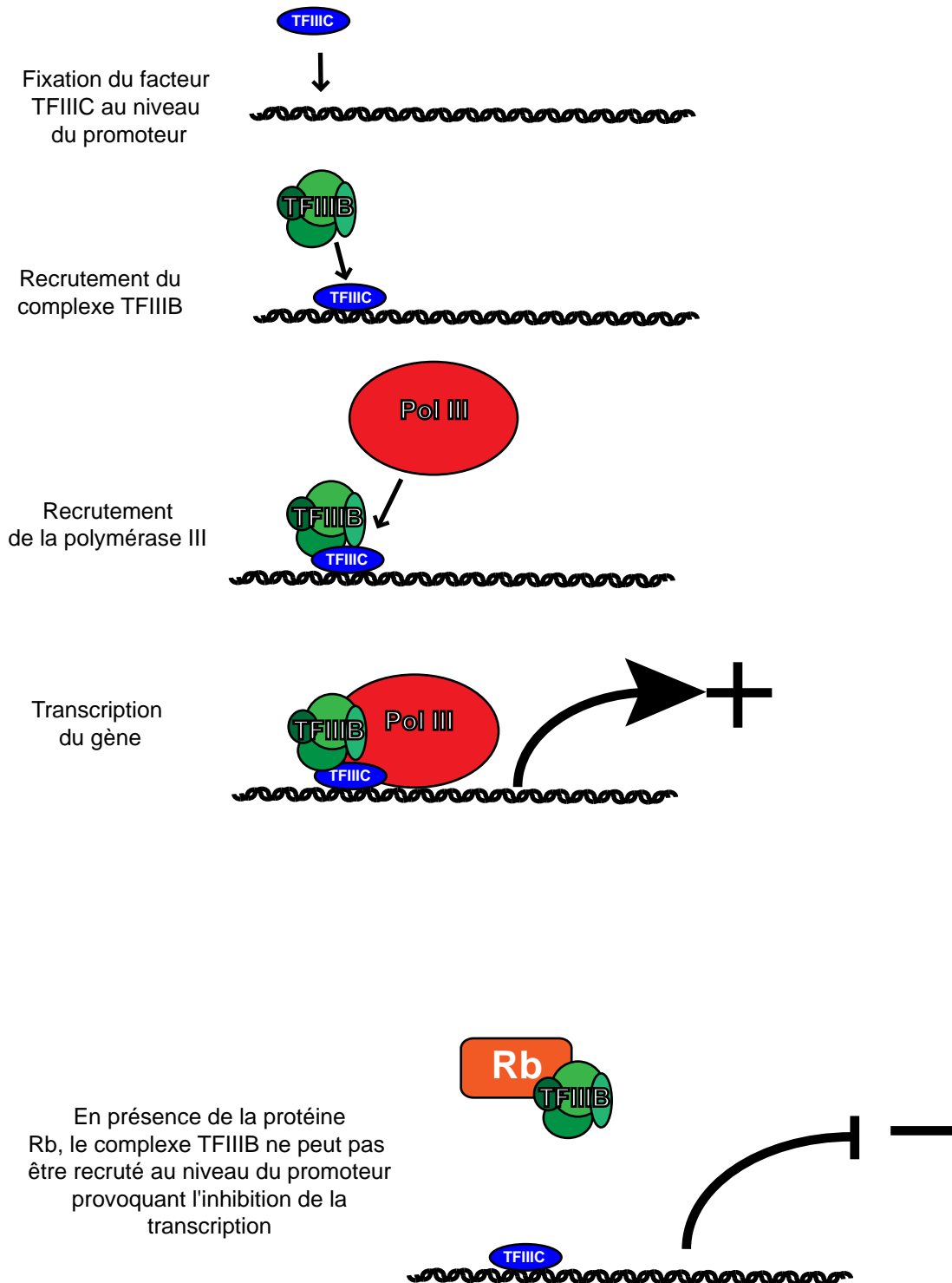


Figure 18: La transcription pol III et sa répression par Rb.

Le promoteur de type III est présent au niveau des gènes codant les ARNsn U6, l'ARN 7SK, l'ARN 7SL et les SINE.

L'initiation de la transcription par la pol III fait intervenir de nombreuses protéines mais la disponibilité des facteurs TFIIB et TFIIC reste un facteur limitant. TFIIC est une protéine de liaison à l'ADN qui se fixe directement au niveau du promoteur (Schramm and Hernandez 2002) (Figure 18). L'association de TFIIC2 à l'ADN permet le recrutement du facteur TFIIB, essentiel pour assurer le positionnement de l'ARN polymérase III au niveau du site d'initiation de transcription (Schramm and Hernandez 2002). TFIIB est un complexe constitué de plusieurs sous-unités dont la protéine TBP de liaison à la boîte TATA ainsi qu'un facteur TAF appelé généralement BRF (TFIIB-related factor) (Buratowski and Zhou 1992, Hernandez 1993).

L'abondance des transcrits pol III est anormalement élevée dans de nombreuses cellules cancéreuses (Schwartz *et al.* 1974). Cela peut être expliqué par le fait que la protéine RB est capable de réguler l'activité de la pol III (White *et al.* 1996). Pour cela, RB interagit avec le facteur de transcription TFIIB (Larminie *et al.* 1997, Chu *et al.* 1997). Cette association empêche son recrutement par TFIIC au niveau du promoteur du gène ce qui rend impossible le positionnement de l'ARN polymérase III (Sutcliffe *et al.* 2000). La présence du domaine « pocket » de la protéine RB est nécessaire et suffisante pour la liaison avec le facteur TFIIB (White *et al.* 1996).

Comme RB, les deux autres protéines à domaine « pocket » p107 et p130 semblent aussi être capable de réprimer la transcription pol III en interagissant avec le facteur TFIIB (Sutcliffe *et al.* 1999).

TFIIC est essentiel dans le recrutement de TFIIB pour la majorité des gènes transcrits par la pol III. Cependant, les promoteurs des gènes de type III codant par exemple pour l'ARN U6 sont capables de recruter directement TFIIB (Lobo *et al.* 1991). Or la transcription de ces gènes est également inhibée par la présence de la protéine RB (Larminie *et al.* 1997). L'action répressive de RB au niveau de ces promoteurs reste à déterminer mais il a été mis en évidence que dans ce cas précis, RB était capable de s'associer au promoteur du gène U6 (Hirsch *et al.* 2004).

Au cours du cycle cellulaire, RB et p130 sont phosphorylées par les complexes cycline/CDK, ce qui a pour conséquence de dissocier la protéine à domaine « pocket » et le

facteur limitant de la transcription TFIIB (Scott *et al.* 2001). Le facteur TFIIB libre pourra alors être recruté par le complexe d'initiation et la transcription par la pol III pourra alors avoir lieu, cela afin d'accumuler des transcrits pol III nécessaires avant l'entrée de la cellule en phase S (Scott *et al.* 2001) (Figure 18).

A ce jour, aucun homologue du facteur TFIIC n'a été mis en évidence chez les plantes. Par contre, même si le facteur TFIIB n'a pas encore été identifié, on trouve chez *Arabidopsis* un gène codant deux TBP différentes (Gasch *et al.* 1990). Il existe également une séquence prédite de BRF dans les banques de données sous le numéro d'accension At2g45100.

La protéine RB est un composant majeur dans le contrôle du cycle cellulaire grâce à sa capacité de régulation des gènes contrôlés par les facteurs E2F. Chez les mammifères, RB est également capable d'agir sur la croissance cellulaire en limitant la synthèse protéique via l'inhibition des ARN polymérase I et III en limitant la disponibilité des facteurs UBF et TFIIB. RB joue donc un rôle clé dans la vie de la cellule en permettant d'établir un lien indispensable entre prolifération et croissance. A ce jour aucune étude n'a pu établir l'existence de cette voie de contrôle de la croissance cellulaire par RB chez les plantes.

XII. L'impact des virus sur le cycle cellulaire via le contrôle de la fonction RB.

XII.1. Les protéines virales à domaine LxCxE.

XII.1.1) Le cas des virus HPV, SV40 et adénovirus.

Certains virus à ADN tel que le papillomavirus humain HPV ou le polyovirus SV40 (Simian Virus 40) dépendent de la machinerie de réplication de leurs cellules hôtes pour permettre la réplication de leur génome viral. Or, la machinerie de réplication ADN de la cellule hôte est disponible uniquement au cours de la phase S du cycle cellulaire. De plus, les adénovirus infectent des cellules différenciées qui ne se divisent donc pas. Certains virus ont

donc développés un système leur permettant d'activer le cycle cellulaire dans des cellules en phase G0. L'infection par ce type de virus conduit donc souvent à l'apparition de certains types de cancers. En effet, plus de 90% des cancers de l'utérus et plus de 50% des autres cancers anogénitaux sont la conséquence d'une infection par le virus HPV (Walboomers *et al.* 1999).

Pour activer le cycle cellulaire, les virus encodent une protéine portant un domaine LxCxE de liaison à la protéine RB. Ainsi, ces virus ont mis en place un système qui leur permet de détourner à leur avantage le processus de régulation du cycle cellulaire.

L'adénovirus a été le premier virus humain décrit comme étant capable d'induire un processus tumoral (Trentin *et al.* 1962). Cependant, les adénovirus n'ont jamais été associés avec l'apparition d'une tumeur chez l'homme. Une des protéines encodées par le génome du virus est l'oncoprotéine E1A. E1A a d'abord été décrite comme pouvant s'associer à une phosphoprotéine qui a été plus tard identifiée comme la protéine RB (Whyte *et al.* 1988). Cette interaction peut se faire grâce à la présence d'un motif LxCxE au niveau carboxy-terminal de la protéine E1A qui lui permet de se lier au domaine « pocket » de RB (Dahiya *et al.* 2000, Whyte *et al.* 1989). D'ailleurs la protéine E1A est également capable de s'associer avec les autres protéines à domaine « pocket » p107 et p130 (Harlow *et al.* 1986).

Un autre exemple de ce mécanisme de contrôle de RB se manifeste au cours d'une infection par le virus SV40 où la protéine grand antigène T (AgT) produite par le virus est capable d'interagir avec les protéines à domaine « pocket » grâce un motif LxCxE présent dans sa séquence codante (DeCaprio *et al.* 1988, Christensen and Imperiale 1995).

Contrairement aux adénovirus, les virus HPV sont connus pour induire l'apparition de cancers chez l'homme (zur Hausen 1996). Comme SV40 et les adénovirus, le génome du virus HPV code une protéine, E7 qui possède un motif LxCxE. Ce motif permet à la protéine virale de s'associer aux protéines à domaine « pocket » et ainsi de libérer les facteurs E2F responsables de l'activation du cycle cellulaire (Chellappan *et al.* 1992).

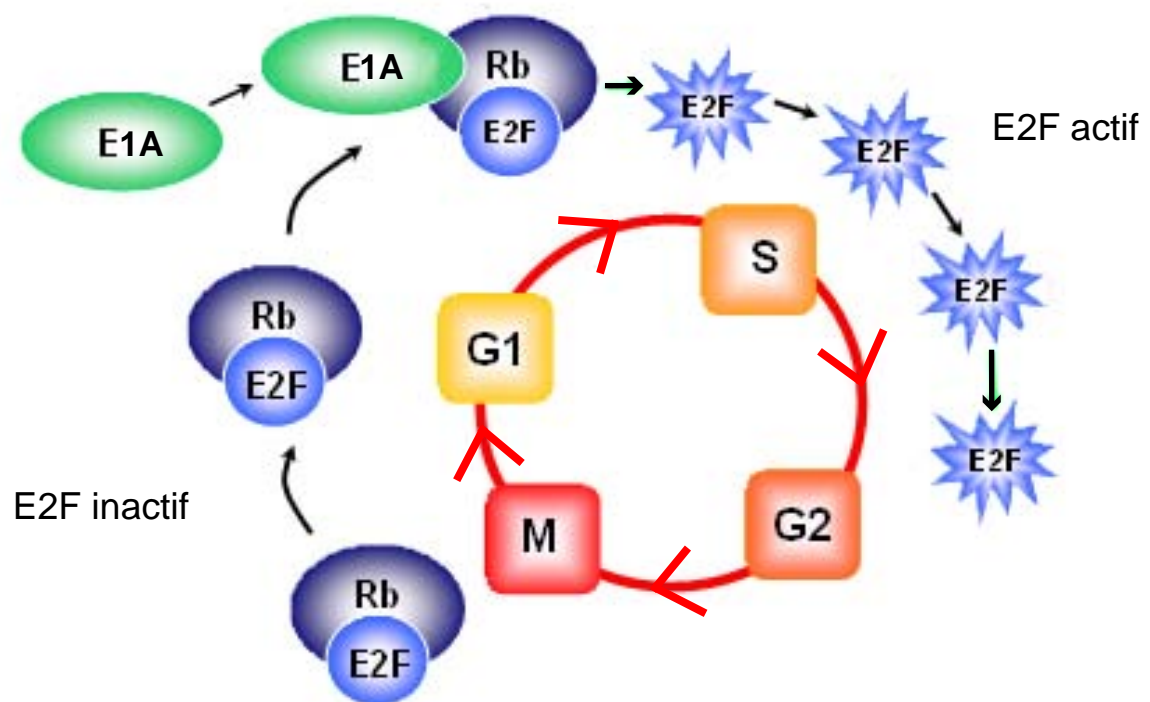


Figure 19 : Impact de la protéine virale E1A sur le cycle cellulaire.

L'interaction de la protéine virale avec Rb conduit à la libération des facteurs E2F lesquels sont responsables de l'activation du cycle cellulaire.

XII.1.2) L'impact des protéines virales sur le cycle cellulaire.

L'interaction entre E1A et les protéines à domaine « pocket » conduit à la dissociation des complexes qu'elles établissent avec les facteurs E2F et provoque ainsi l'activation de la transcription des gènes contrôlés par ces facteurs ce qui conduit la cellule à entrer en phase S (Bagchi *et al.* 1990, Ghosh and Harter 2003) (Figure 19). Il semblerait également qu'E1A inhibe la fonction RB en modifiant son niveau de phosphorylation ou en provoquant son acétylation (Chan *et al.* 2001, Kleinberger and Shenk 1991, Wang *et al.* 1991).

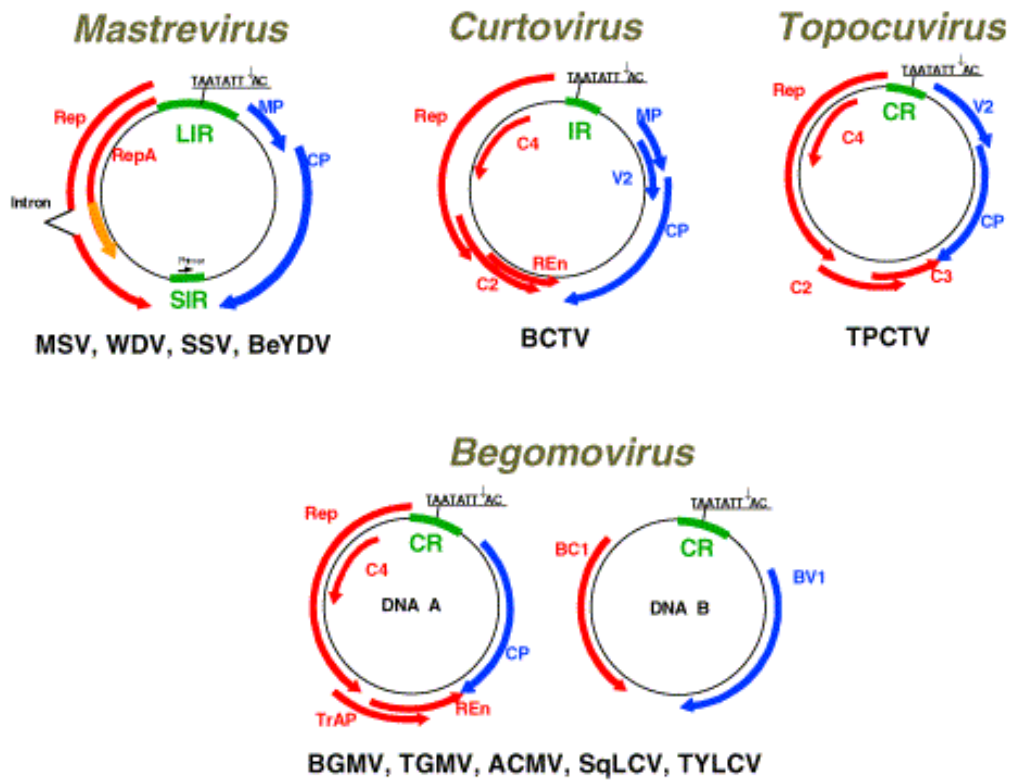
Comme E1A, l'interaction d'AgT avec les protéines de type RB conduit à sa dissociation d'avec les facteurs E2F (Chellappan *et al.* 1992). De plus, AgT est capable d'altérer le niveau de phosphorylation des protéines p107 et p130 mais ne semble pas avoir d'effet sur la phosphorylation de RB (Stubdal *et al.* 1996). Parallèlement, AgT semble induire la dégradation protéolytique de p130 sans affecter la stabilité de p130 et de RB (Stubdal *et al.* 1997).

La protéine virale E7 se lie aux protéines à domaine « pocket » par l'intermédiaire de son domaine LxCxE ce qui permet la libération des facteurs de transcriptions E2F (Chellappan *et al.* 1992). Cette libération passe par la dissociation du complexe RB-E2F mais également par la dégradation de RB (Berezutskaya *et al.* 1997).

XII.2. Les virus ADN de plantes.

Les virus de plantes qui possèdent un génome ADN sont généralement classés en deux catégories distinctes. On trouve les virus possédant un génome ADN circulaire double brin qui se réplique par réverse transcription d'un intermédiaire ARN (caulimovirus et badnavirus) et ceux constitués de molécules d'ADN circulaires simple brin qui se répliquent par le mécanisme des cercles roulants (gémiovirus et nanovirus).

A



B

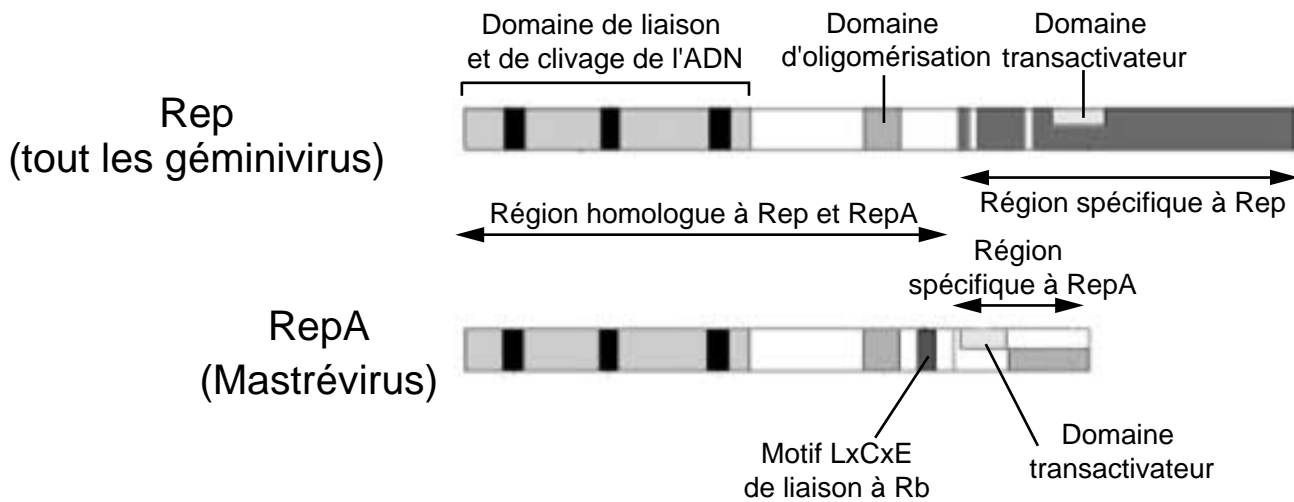


Figure 20: Les géminivirus de plantes

A: Génome des 4 géminivirus. Les différents cadres de lecture sont indiqués par des flèches.

B: Représentation de la structure des protéines Rep et RepA.

(D'après Guitierrez, 2000)

XII.2.1) Le cas des gémiovirus.

Les gémiovirus sont divisés en quatre genres en fonction de l'organisation de leurs génomes, leurs hôtes et leurs vecteurs d'infection. En effet certains sont transmis par la mouche blanche (Begomovirus) d'autre par les citadelles (Mastrevirus et Curtovirus) et enfin par les membracidés comme le demi-diable (Topocuvirus) (Figure 20). Les gémiovirus sont une contrainte majeure pour l'agriculture dans les régions tropicales et sub-tropicales. Récemment, ces virus ont même été retrouvés dans des régions plus tempérées à cause des pratiques agricoles et de la mondialisation des échanges de produits qui facilite la dissémination des insectes vecteurs. Pour assurer leur réplication, ces virus à ADN ont besoin de la machinerie de réplication de leurs hôtes. Pour cela certaines familles de virus tel que les gémiovirus ont développé une stratégie leur permettant d'activer le cycle cellulaire (Nagar *et al.* 2002). Pour cela, les gémiovirus expriment une protéine, la protéine Rep (Figure 20). C'est une protéine multifonctionnelle qui joue un rôle essentiel dans la réplication du génome viral. Elle est en effet nécessaire et suffisante pour assurer la réplication des gémiovirus. La protéine Rep est aussi capable de lier la protéine RB conduisant à l'induction du cycle cellulaire (Kong *et al.* 2000). Certaines protéines Rep possèdent un motif de liaison de type LxCxE à la protéine RB. Cependant, l'association de Rep à RB ne semble pas toujours dépendre de la présence d'un tel motif, en effet, la protéine Rep du Bégomovirus ne possède pas de domaine LxCxE de liaison à RB mais induit le cycle cellulaire (Nagar, Hanley-Bowdoin and Robertson 2002, Nagar *et al.* 1995). Le génome des Mastrevirus code, en plus d'une protéine Rep classique, pour une protéine RepA contenant également un motif LxCxE qui lui permet d'interagir avec la protéine RB des plantes et de mammifères (Liu *et al.* 1999, Xie *et al.* 1995) (Figure 20). Une protéine RepA possédant un motif LxCxE intact augmente l'infectiosité du virus suggérant que cette protéine est capable d'activer le cycle cellulaire favorisant ainsi l'infection (Xie, Suarez-Lopez and Gutierrez 1995).

XII.2.2) Un exemple de nanovirus : le Faba Bean Necrotic Yellow Virus.

Le second membre des virus de plantes à ADN simple brin sont les nanovirus. Les quatre espèces qui appartiennent à cette famille de virus sont le Subterranean clover stunt virus, le Banana bunchy top virus, Milk vetch dwarf virus et le le Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV) (Chu and Helms 1988; Katul *et al.* 1997; Harding *et al.* 1991).

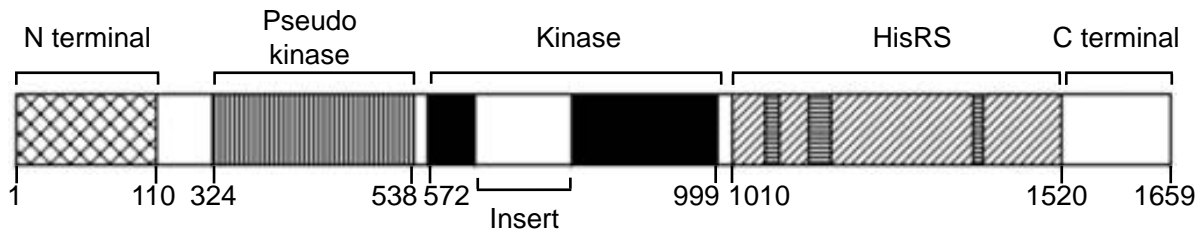
Le génome Faba bean necrotic yellow virus est constitué de 8 molécules d'ADN circulaires simple brin encapsidées séparément (Katul *et al.* 1995, Katul *et al.* 1998) (Figure 21). Ce virus est transmis par l'intermédiaire d'un insecte piqueur, l'aphide (*Aphis craccivora*) (Franz *et al.* 1998) (Figure 21). Le Faba bean necrotic yellow virus est capable d'infecter plus de 60 espèces végétales, la majorité appartenant à la famille des *Fabaceae* comme le pois, l'arachide ou le haricot (Franz *et al.* 1995, Franz *et al.* 1997). On retrouve le FBNYV dans l'ouest de l'Asie ainsi que dans le nord de l'Afrique où il est la cause de graves infections de plantes cultivées (Franz, Makkouk and Vetten 1997, Makkouk and S. G. 1994) (Figure 21). FBNYV code pour 5 protéines Rep différentes intervenant dans la réplication du virus, aucune d'entre elles ne possède un motif de liaison à RB de type LxCxE (Katul *et al.* 1998). Cependant, son génome code pour une protéine, CLINK (Cell-cycle link) dont la séquence en acides aminés présente un motif LxCxE conservé dans toute la famille des nanovirus (Aronson *et al.* 2000, Katul *et al.* 1998) (Figure 21). Cette protéine est d'ailleurs capable de lier *in vitro* la protéine RB humaine ainsi que son homologue du maïs par l'intermédiaire de ce motif (Aronson *et al.* 2000). La protéine CLINK favorise l'infection virale mais n'est cependant pas essentielle pour le développement des nanovirus (Timchenko *et al.* 2006). La capacité de CLINK à agir sur la fonction de la protéine RB reste donc à déterminer. CLINK est d'ailleurs capable de lier la protéine SKP1 laquelle fait partie du complexe de ciblage intervenant dans la prise en charge des protéines pour la dégradation par le protéasome (Aronson *et al.* 2000).

Partie II : Les kinases d'eIF2 alpha et le contrôle de la traduction

Chez les mammifères, l'élément SINE Alu est capable de jouer un rôle riborégulateur dans la physiologie de la cellule. En effet, nous avons vu que sa transcription était activée à la suite d'un stress tel que l'infection viral ou le choc thermique. Les transcrits Alu ainsi produits sont alors capables de réguler l'activité de la protéine PKR, une des kinases responsable de la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . Lorsque ce facteur est phosphorylé, la traduction des protéines est inhibée à l'intérieur de la cellule. Ainsi, les éléments SINE sont capables d'intervenir dans des processus clefs de la cellule comme le mécanisme de régulation de la traduction.

La seule kinase d'eIF2 α identifiée chez les plantes est la protéine GCN2. Chez les mammifères et chez la levure, l'activité kinase de GCN2 est activée en présence d'ARNt libres lesquels s'associent avec le domaine de liaison à l'ARN double brin que possède la protéine. Or, nous avons vu que chez les plantes, le SINE SB1 est capable de lier certaines protéines à domaine de liaisons à l'ARN double brin comme la protéine HYL1 afin de moduler sa fonction dans la cellule. D'autre part, la plupart des éléments SINE possèdent une partie 5' dérivée d'un ARN de transfert, une famille d'ARN dont la structure secondaire en trèfle est parfaitement connue. De plus, les éléments SINE possèdent d'ailleurs une structure tridimensionnelle conservée. Il semble donc envisageable que dans le monde végétal, l'activité de la protéine kinase GCN2 soit contrôlée par un ARN SINE.

A



B

		$\alpha 1$	$\beta 1$	$\beta 2$				
<i>M. musculus</i>	"	MAGGRGASGRGRAEPQESY	SQRQDH	ELQALEAI	YGSD	FQDLR---	PDARGRVREPPPE	INLVL"
<i>R. norvegicus</i>		MAGGRGAAGRGPAEPQESY	SQRQDH	ELQALEAI	YGSD	FQDLR---	PDARGRVREPPPE	INLVL
<i>H. sapiens</i>		MAGGRGAPGRGRDEPPESY	PQRQDH	ELQALEAI	YGAD	FQDLR---	PDACGPVKEPPPE	INLVL
<i>F. rubripes</i>		MSSQLTPADR-----	TDERTTQDN	ELALAS	IFGDD	FQDLR---	NSDPWKVKRPPPE	EVYLC
<i>D. melanogaster</i>		MADEKAKESFRERQAC	EE	EVIKS	IFGCD	VEDLRPQAN	PSLWKPTD-	IRIQLTP
<i>A. gambiae</i>		WSRGRNCRSSIAMAKKETIRERQEN	EE	EVIKS	IFHDE	VEDLR---	PRT-GKWK-	PIELRLHL
<i>C. elegans</i>		MTKENQIVLDERVKENQHLQEE	EE	KLALDAV	YLNQI	ITYIKAHWHV	WVPTNCHILL	KALDS
<i>N. crassa</i>		TTFPGLKAPGQTPPAKTHYQEVQES	EE	VMVLOAI	IYGED	FTQHE---	AAHGAWQKSE	PRFDIKI
<i>S. cerevisiae</i>		MSLSHLTLDOYYEIQCE	EE	EAIRSI	IYMD	FTDLT---	KRKSSWDKQ	POIIFEITL
<i>S. pombe</i>		MDAAKRLLELCLEIQCE	EE	EALKAI	IFMDD	FEEK---	VRNAWNVTNG	HVYCIHL
<i>A. thaliana</i>		GGSGRRGQLKDHGSNADEDNEL	SE	ETALSAI	IFQED	CKVVS---	DSRSPFQ---	IAIKLRP

		$\beta 3$	$\beta 4$	$\alpha 2$					
<i>M. musculus</i>	"	YPOGL-AGEEVYVQVELQV	KCPPT	YPOVV	PEIELKNAK	GLSNES	VNL	LKSHLEELAKKQ"	--
<i>R. norvegicus</i>		YPOGL-AGEEVYVQVELQV	KCPPT	YPOVV	PEIELKNTK	GLSNES	VNL	LKSHLEELAKKQ	---
<i>H. sapiens</i>		YPOGL-TGEEVYVQVLD	RVKCPPT	YPOVV	PEIELKNAK	GLSNES	VNL	LKSRLEELAKKH	---
<i>F. rubripes</i>		RPNGLNNGQGCYATVD	LQVKCPPT	YPOVV	PEIELKNAK	GLSNEK	LQNL	QSELNKLAA	---
<i>D. melanogaster</i>		LRDSS-NGLETIVCTK	LHVTCPS	YPKLP	PKISLEES	SKGMSD	QLEAL	LRNQLQA	OSQEL---
<i>A. gambiae</i>		TPQRG-SAKEAYVKAD	LYVTCSP	YPKCP	PKLELKH	AVGLSD	SLVREL	LTEKLEQLA	DEL---
<i>C. elegans</i>		CFLNGDPLGSKSLSVI	LHVKCEP	YPOVN	PAVDLLD	PQGLSK	EDVON	LTLILQ	MAADTW---
<i>N. crassa</i>		KP---SSDQ-ELSVTL	GVVMVAT	YPKTP	PLLTIKDD	HSLREST	KFKI	QKFVETQ	PKIY-AQ
<i>S. cerevisiae</i>		RSVD-KEPV--ESSIT	LHFAMTP	YPVTA	PEIEFKN	VQNVMD	SQLOM	LKSEFKKI	HNTS---
<i>S. pombe</i>		CSRSA-NSKS-IAKLD	LCELGRS	YPVVK	PVIKL	ONGENV	LN	SQIRF	LLDKLDTKAKDL---
<i>A. thaliana</i>		YSKDMGYEDT-DISAM	LIVRCLP	GPYKCP	PKLQIT	PEQGLT	TADA	EKL	LSLLEDQANSN-AR

		$\alpha 3$	
<i>M. musculus</i>	"	CGEVM	IFELAHHVQSEFLSEHNKPPPKSFH"
<i>R. norvegicus</i>		CGEVM	IFELAHHVQSEFLSEHNKPPPKSFH
<i>H. sapiens</i>		CGEVM	IFELAYHVQSEFLSEHNKPPPKSFH
<i>F. rubripes</i>		CGEVM	IFELADHIQSEFLSEHNKPPPKSFH
<i>D. melanogaster</i>		RGEVM	IFELAQTVOAFLEHNKPPPKGSFY
<i>A. gambiae</i>		KGEVM	IFELANTVOAFLEHNNVPPPKGSFY
<i>C. elegans</i>		EGCVVI	IFELAHVRREFLTDHTPRPAGSFH
<i>N. crassa</i>		AEQEMI	IQIVEGIRDILEEAAQKKVOGLE
<i>S. cerevisiae</i>		RGQEI	IFETTSFTQELDEFQNVVNTOSL
<i>S. pombe</i>		LGEEMI	IFELASIVQDYLDNDWQSDLSQFA
<i>A. thaliana</i>		EGRVM	IFNLVAAQEFLEIIPESHDEES

(D'après Nameki *et al*, 2004)

Figure 22: Structure de la protéine GCN2

A: Représentation schématique des différents domaines de GCN2 chez *Saccharomyces cerevisiae*.

B: Alignement de la séquence en acides aminés du domaine N terminal des protéines GCN2 chez diverses espèces. Les résidus conservés sont indiqués en gras. Les 3 hélices α et les 4 feuillets β sont respectivement représentés en rose et en vert.

I. Généralités.

Dans sa définition la plus large, le stress est la réponse d'un système à des perturbations de son niveau normal. Pour une cellule ou un organisme, un stress peut être causé par des changements risquant de causer une menace pour la survie de la cellule (comme par exemple le manque de nutriments) mais aussi par des processus naturels et indispensables comme l'alimentation. L'adaptation aux changements de l'environnement extracellulaire est un enjeu critique pour la survie d'une cellule. La phosphorylation de la sous unité α du facteur eIF2 (eukaryotic Initiation Factor 2) est un mécanisme conservé de régulation de la synthèse protéique en réponse à de nombreux stress.

II. Les kinases d'eIF2 alpha.

II.1. GCN2.

II.1.1) Structure de la protéine.

La kinase GCN2 a d'abord été mise en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, des homologues de GCN2 ont été découverts chez d'autres eukaryotes inférieurs comme *Neurospora crassa* mais également chez les eukaryotes supérieurs avec des homologues présents chez les mammifères, la drosophile la plante *Arabidopsis thaliana* (Berlanga *et al.* 1999, Santoyo *et al.* 1997, Sattlegger *et al.* 1998, Zhang *et al.* 2003).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine GCN2 a une taille de 1659 acides aminés (Figure 22). Elle est constituée d'un domaine amino-terminal très conservé (1-110) suivi d'un domaine pseudo-kinase (324-538). On trouve ensuite le domaine kinase (572-999) et le domaine de liaison à l'ARNt de type Histine tRNA Synthase (HisRS) (1010-1520). Enfin à l'extrémité carboxy-terminale, on trouve le domaine de dimérisation et de liaison au ribosome (1585-1659). A l'exception d'*Arabidopsis*, les homologues de GCN2 ont gardé cette structure avec un niveau d'homologie maximal pour le domaine kinase et le domaine HisRS (Figure22).

La région amino-terminale de la protéine GCN2 présente des similarités avec des domaines présents dans la séquence d'autres protéines eukaryotes. En effet, cette région a été

appelée RWD car elle présente des homologies avec des domaines de type « RING finger », de type « WD-repeat » (répétition de tryptophanes et d'aspartames) et d'hélicase « DEAD-like » (Doerks *et al.* 2002). La structure de ce domaine RWD a été cristallisée récemment (Nameki *et al.* 2004). Ainsi, ce domaine est formé d'une couche de quatre feuillets β recouverte de trois hélices α (Figure 22). Certains résidus clefs sont très conservés chez les espèces, suggérant que la fonction de ce domaine amino-terminal est conservée parmi les eucaryotes (Figure 22). Le domaine RWD de GCN2 permet à la protéine de s'associer avec la protéine GCN1 chez *Saccharomyces* (Garcia-Barrio *et al.* 2000, Kubota *et al.* 2000). L'hélice α -3 présente dans le domaine RWD de GCN2 semble d'ailleurs jouer un rôle essentiel dans la reconnaissance de GCN1 (Nameki *et al.* 2004) (Figure 22). L'association du complexe GCN1/GCN20 avec GCN2 faciliterait le transfert d'ARNt libres du ribosome au domaine de liaison HisRS de GCN2 (Sattlegger and Hinnebusch 2000). En effet, GCN1 est capable de s'associer à la fois avec GCN2 et le ribosome (Sattlegger and Hinnebusch 2005). La présence de ces deux protéines est d'ailleurs essentielle pour la fonction kinase de GCN2 et des mutations dans le domaine RWD au niveau des résidus importants pour la liaison avec GCN1 diminue l'activité de GCN2 (Marton *et al.* 1993, Vazquez de Aldana *et al.* 1995).

La région pseudokinase est constituée de multiples sous-domaines présents dans des protéines kinases eucaryotiques. Cependant, les sous-domaines importants pour la liaison avec l'ATP et l'activité catalytique semblent être absents du pseudo-domaine kinase de GCN2 (Hanks and Hunter 1995, Wek *et al.* 1989). La fonction de ce domaine reste encore à élucider. Ce domaine kinase dégénéré pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activité kinase de GCN2 dans des conditions non carencées en acides aminés, période durant laquelle GCN2 est inactive. En effet, ce domaine est capable d'interagir avec le domaine catalytique de GCN2 (Qiu *et al.* 1998). Il est proposé que cette interaction puisse permettre l'inhibition de GCN2 en empêchant la dimérisation de la protéine, en bloquant son autophosphorylation ou en l'empêchant de reconnaître son substrat. D'autre part, le domaine pseudokinase est nécessaire dans la fonction de GCN2 en condition de carence en acides aminés (Wek *et al.* 1990). Il semble donc que l'interaction entre ce domaine et le reste de la protéine joue aussi un rôle dans des conditions où la protéine GCN2 est active.

La présence du domaine kinase de GCN2 a été mise en évidence à cause de sa forte homologie avec le domaine catalytique des protéines kinases eucaryotes, ce qui a permis de

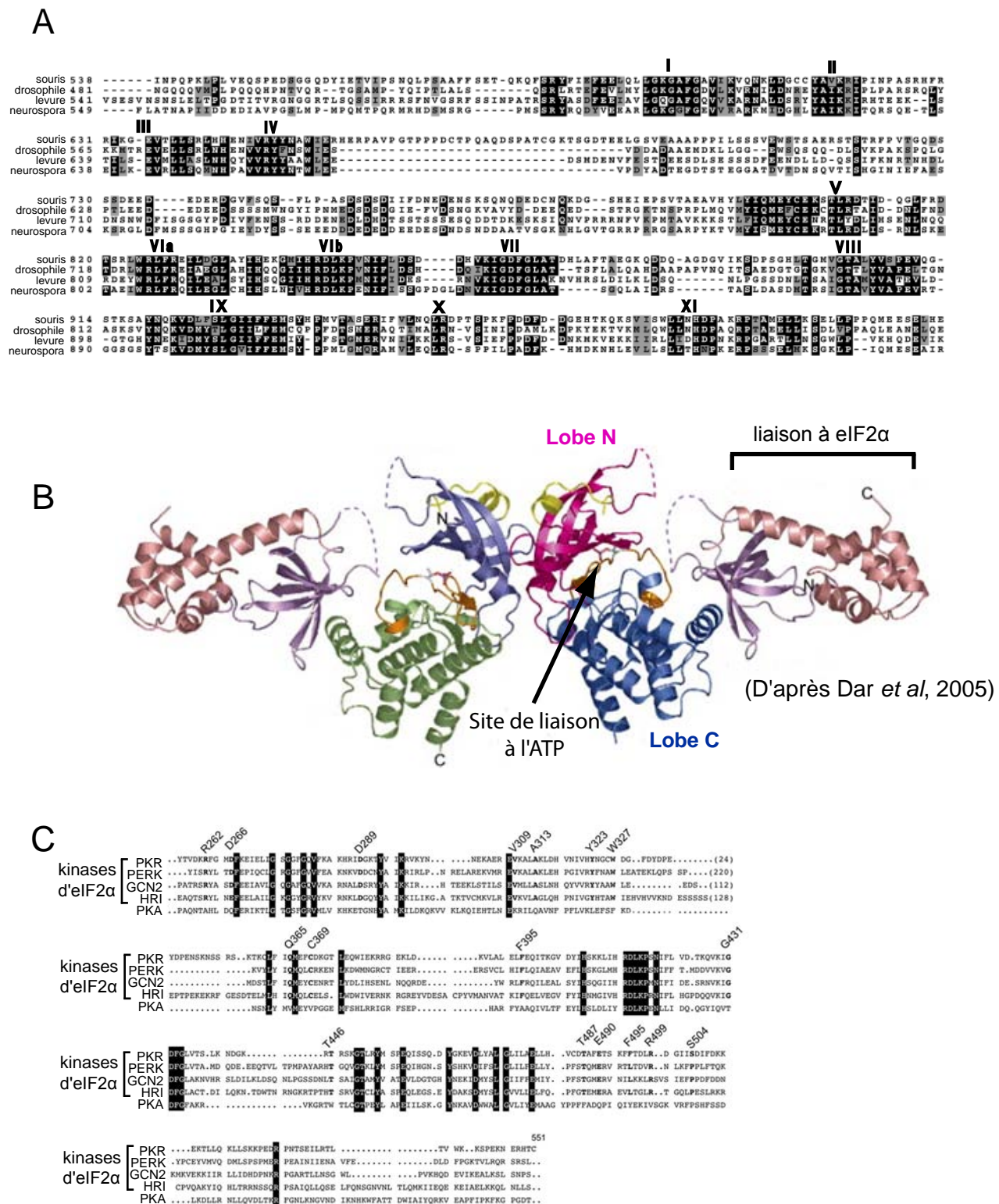


Figure 23: Le domaine catalytique des kinases d'eIF2 α .

- A: Comparaison de la séquence en acides aminés des domaines kinases des protéines GCN2 chez différentes espèces. Les 11 sous-domaines conservés chez les protéines kinases sont indiqués.
- B: Prédiction de la structure tertiaire du domaine kinase.
- C: Comparaison de la séquence en acides aminés des domaines kinases. Les résidus conservés chez les protéines kinases sont surlignés en noir et les 11 résidus conservés uniquement chez les kinases d'eIF2 α sont indiqués en gras.

démontrer très tôt que GCN2 possédait une activité de phosphorylation dans des conditions de carence alimentaire (Roussou *et al.* 1988). En effet, la protéine GCN2 possède au niveau de son domaine kinase les 11 sous-domaines caractéristiques retrouvés au niveau des protéines à fonction kinase (Hanks *et al.* 1988). Les acides-aminés présents au niveau de ces 11 sous-domaines sont d'ailleurs fortement conservés dans toutes les protéines GCN2 (Figure 23). Le domaine catalytique des protéines kinases possède une structure de double lobe classique avec un petit lobe en N-terminal (N lobe) et un lobe plus grand en C-terminal (C-lobe), connectés ensemble par une charnière de taille réduite (Figure 23) (Huse and Kuriyan 2002). Le domaine catalytique de GCN2 a conservé cette structure de double lobes (Padyana *et al.* 2005).

La comparaison entre les kinases d'eIF2 α et d'autres types de protéine kinase montre la présence de 17 résidus conservés uniquement entre les kinases d'eIF2 α (Dar *et al.* 2005) (Figure 23). Ces résidus sont probablement responsables des propriétés spécifiques de ce type de kinase en particulier la reconnaissance de leur substrat : eIF2 α . En effet, des résidus thréonines et phénylalanines permettent la formation d'une hélice α au niveau du lobe C et cela, uniquement chez les kinases d'eIF2 α (Figure 23) (Dey *et al.* 2005). Cette hélice permet à ces kinases d'adopter une structure originale leur permettant la reconnaissance du facteur eIF2 α (Dey *et al.* 2005).

Une des régions les mieux caractérisées de ce domaine catalytique est le domaine de liaison à l'ATP. L'étude par cristallographie a permis de montrer que la molécule d'ATP se fixe au niveau du plis formé par les lobes N et C (Figure 23) (Dar, Dever and Sicheri 2005, Padyana *et al.* 2005). De nombreux résidus du domaine catalytique de la kinase interviennent dans la liaison à l'ATP. Ainsi il semble que de manière générale, le domaine de liaison à l'ATP est constitué d'un motif conservé Gly-X-Gly-X-X-Gly-X-Val suivi d'un motif Ala-X-Lys 13 à 18 résidus plus loin (Hanks, Quinn and Hunter 1988). On retrouve cette configuration dans les kinases d'eIF2 α en particulier au niveau du domaine I (Figure 23). Le résidu lysine semble particulièrement important puisque qu'il interviendrait directement dans la réaction de transfert de l'ATP. Sa mutation chez GCN2 conduit d'ailleurs à la perte complète de l'activité kinase (Wek, Jackson and Hinnebusch 1989). L'étude par cristallographie de ce domaine de liaison à l'ATP a confirmé les hypothèses précédentes en mettant en évidence la formation d'une poche hydrophobe au niveau de la charnière entre les deux lobes de la

[illegible]

HisRS dimère

PK dimère

90°

90°

ARNt

surface de contact à l'ARNt

Dimère PK₂HisRS₂

(D'après Padyana *et al*, 2005)

Figure 24: Le domaine HisRS de liaison à l'ARNt de GCN2.

A: Alignement de la séquence en acides aminés du domaine HisRS des protéines GCN2 de différentes espèces. La position des motifs m1, m2 et m3 est indiquée.

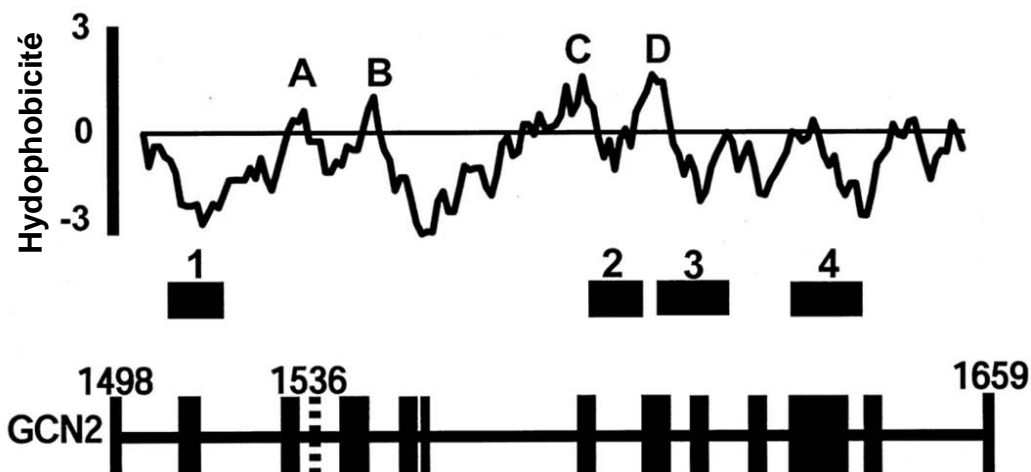
B: Prédiction de la structure tertiaire du domaine HisRS et du domaine kinase (PK) de GCN2. La dimérisation des différents domaines est présentée ainsi que le site de fixation de l'ARNt.

protéine grâce à des résidus acides aminés conservés parmi les différentes GCN2 (Padyana *et al.* 2005) (Figure 23).

Le domaine HisRS constitue le domaine de liaison de GCN2 à l'ARNt. Son nom provient de sa forte homologie avec l'enzyme chargée du couplage ARNt-acide aminé : l'histidyl ARNt-Synthétase (Natsoulis *et al.* 1986, Wek, Jackson and Hinnebusch 1989). Le domaine HisRS est capable d'interagir avec l'ARNt libre *in vitro* (Wek *et al.* 1995). Cette capacité de liaison à l'ARNt est essentielle pour activer GCN2, car une mutation au niveau de ce domaine peut engendrer la perte de fonction de la protéine (Wek, Zhu and Wek 1995, Zhu *et al.* 1996). GCN2 est capable de lier tous les types d'ARNt mais a beaucoup plus d'affinité pour les ARNt libres que pour les ARNt aminoacylés (Dong *et al.* 2000). On retrouve des domaines de type HisRS conservés dans tous les homologues de GCN2 suggérant que les ARNt sont aussi les ligands activateurs de ces protéines (Berlanga, Santoyo and De Haro 1999, Santoyo *et al.* 1997, Sattlegger, Hinnebusch and Barthelmess 1998, Zhang *et al.* 2003)(Figure 24). Le domaine HisRS est constitué de trois motifs conservés m1, m2 et m3 présents dans les aminoacyl ARNt synthétases (Ramirez *et al.* 1992)(Figure 24). Le motif m2 se replie en deux feuillets β responsables de l'interaction entre l'ARNt synthétase et la tige des ARNt (Ruff *et al.* 1991). Il est probable que ce motif très conservé chez GCN2 assure une fonction similaire dans la liaison avec aux ARNt. D'autre part, le domaine HisRS contient deux domaines de dimérisation distincts qui permettent l'association avec l'ARNt (Figure 24) (Qiu *et al.* 2001). Cependant, la suppression de ces domaines n'empêche pas la dimérisation de la protéine dans sa totalité laquelle se fait aussi *via* le domaine carboxy-terminal de la protéine (Qiu, Garcia-Barrio and Hinnebusch 1998). Il semblerait que la dimérisation du domaine HisRS facilite la liaison à l'ARNt ainsi que l'activation de la fonction kinase (Qiu, Dong, Hu, Francklyn and Hinnebusch 2001) (Figure 24).

Le domaine carboxy-terminal (CTD) de la protéine GCN2 est responsable de la dimérisation de la protéine *in vivo* (Qiu, Garcia-Barrio and Hinnebusch 1998). Cette dimérisation est essentielle dans la fonction de la protéine et fait intervenir des résidus hydrophobes (Narasimhan *et al.* 2004) (Figure 25). En effet, chez *Saccharomyces*, on trouve dans la région carboxy-terminale de GCN2 quatre domaines hydrophobes, A, B, C et D, dont la mutation empêche la formation d'un dimère *in vivo* (Figure 25). Ainsi GCN2 serait présent

A



(D'après Narasimhan *et al*, 2004)

B

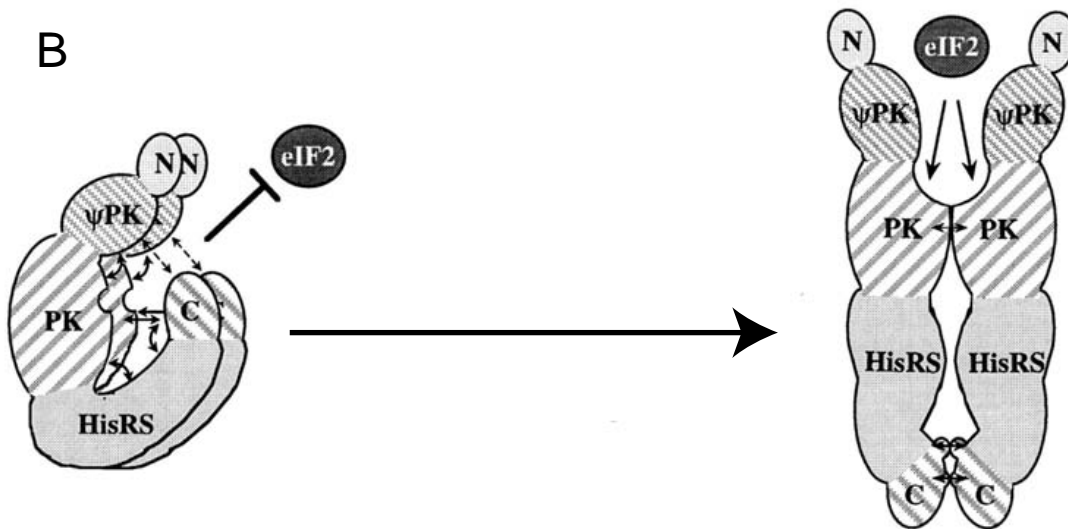


Figure 25: Le domaine C terminal de GCN2

- A: Les 4 domaines hydrophobes de la région C terminale de GCN2 nécessaires dans la dimérisation.
- B: La dimérisation de la protéine GCN2 au niveau du domaine protéine kinase (PK) et au niveau C terminal (C). Les interactions entre les différents domaines sont également indiqués.

sous une forme dimérique en conditions de carences en acides aminés mais aussi dans des conditions normales (Qiu *et al.* 2001).

Un autre domaine de la région CTD important pour la régulation de GCN2 situé dans cette région carboxy-terminal est le domaine de liaison au ribosome qui permet de localiser la protéine au niveau de la machinerie traductionnelle. En effet ce domaine CTD est capable d'interagir avec la sous-unité 60S des ribosomes (Ramirez *et al.* 1991, Zhu and Wek 1998). Cette interaction semble avoir lieu indépendamment de l'association avec un ARNt et de l'autophosphorylation de la protéine (Zhu and Wek 1998). La présence de résidus lysines semble être essentielle pour la liaison avec les ribosomes (Zhu and Wek 1998).

La région CTD présente également une certaine homologie avec des protéines à domaine de liaison à l'ARN, les protéines DRBD (Double-stranded RNA-Binding Domain) (Zhu and Wek 1998). Les résidus lysines présents dans cette région sont essentiels pour la liaison avec des molécules d'ARN double brin *in vitro* suggérant que l'interaction avec l'ARNr permettrait aussi de localiser GCN2 au niveau des ribosomes (Zhu and Wek 1998). Il est également envisageable que ce domaine CTD participe à la reconnaissance de l'ARNt libre par le domaine HisRS. Le domaine carboxy-terminal est aussi capable d'interagir indépendamment avec le domaine kinase ainsi qu'avec le domaine HisRS (Qiu, Garcia-Barrio and Hinnebusch 1998).

II.1.2) Activation de GCN2.

a. A la suite d'une carence en acides aminés.

Chez la levure *S. cerevisiae*, la carence d'un seul acide aminé ou un défaut dans une aminoacyl-ARNt synthétase stimule l'expression de plus de 30 gènes intervenant dans la biosynthèse des acides aminés (Hinnebusch 1988). Ainsi, à la suite d'une carence en histidine, GCN2 phosphoryle le facteur eIF2 α *in vivo* (Dever *et al.* 1992). Le domaine HisRS de GCN2 a la capacité de mesurer la quantité d'ARNt libres qui s'accumulent à la suite d'une carence en acides aminés (Wek, Jackson and Hinnebusch 1989). GCN2 est en effet capable de phosphoryler eIF2 α en réponse à une carence en n'importe lequel des acides aminés (Wek, Zhu and Wek 1995). Il semblerait que la liaison d'un ARNt avec le domaine HisRS provoque un changement de la conformation de GCN2, responsable de la stimulation de son activité

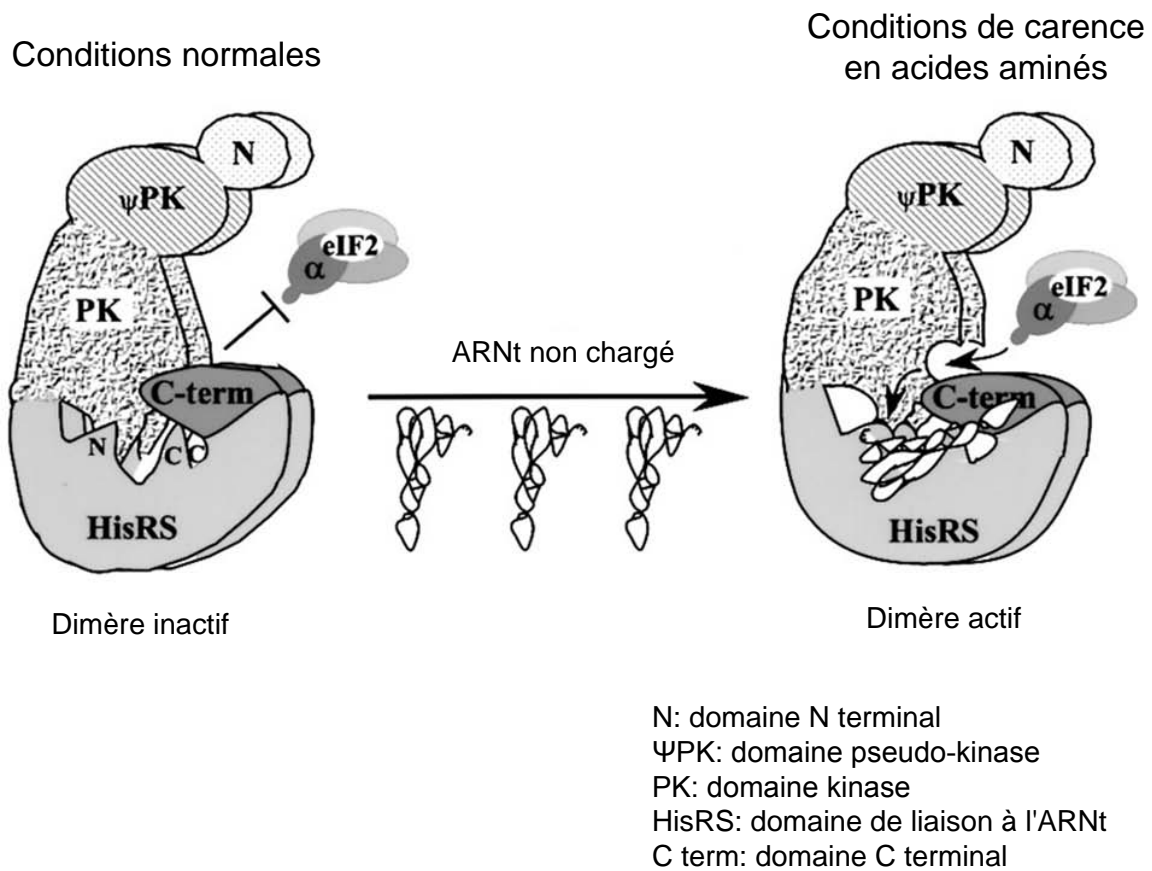


Figure 26: Activation de GCN2 par la liaison avec un ARNt.

La liaison d'une molécule d'ARNt au niveau du domaine HisRS provoque un changement de conformation de la protéine permettant l'activation du domaine kinase.

kinase (Figure 26). En effet, dans des conditions normales, les domaines HisRS et carboxy-terminal de GCN2 interagissent avec le domaine kinase de la protéine, cette interaction a pour conséquence l'inhibition de l'activité kinase (Qiu, Garcia-Barrio and Hinnebusch 1998). La structure de GCN2 semble très dynamique, une région riche en lysine présent dans le domaine carboxy-terminal de GCN2 est également nécessaire pour l'interaction entre l'ARNt et le domaine HisRS (Dong *et al.* 2000). Il semble que la fixation de l'ARNt au niveau du domaine HisRS conduise à une modification de conformation de la protéine permettant au domaine kinase de devenir actif (Figure 26) (Padyana *et al.*, 2005). En effet, des mutations au niveau de certains résidus présent au niveau du domaine kinase conduisent à une activation en continu de la fonction kinase de GCN2 laquelle n'est plus régulée par la liaison avec un ARNt (Qiu *et al.* 2002, Ramirez *et al.* 1992). Cela suggère que la conformation du domaine kinase de GCN2 est essentielle dans la régulation de l'activité kinase. La liaison avec l'ARNt induirait un changement de conformation de la protéine activant le domaine kinase (Padyana *et al.* 2005).

b. Carence en purine.

La carence en purine provoque la phosphorylation d'eIF2 α *in vivo* (Rolfes and Hinnebusch 1993). Cette phosphorylation nécessite la présence de GCN2 suggérant que le manque de purines induit l'activation de la protéine kinase. Ces expériences ont été réalisées dans des conditions où le milieu de culture était supplémenté avec l'ensemble des acides aminés. L'activation de GCN2 à la suite d'une carence en purines ne semble donc pas être une conséquence d'un défaut au niveau de la voie de synthèse des acides aminés causé par le manque de purines. La carence en purines serait en fait responsable d'une inhibition de l'aminacylation des ARNt. En effet, des molécules d'ATP sont essentielles pour le processus de liaison entre un acide aminé et son ARNt correspondant (Airas 1988, Torres-Larios *et al.* 2003). Le manque d'ATP causé par la carence en purines serait capable d'empêcher l'aminacyl-ARNt synthétase de fonctionner ce qui conduirait à l'accumulation d'ARNt libres dans la cellule. Ces ARNt libres seraient alors reconnus par le domaine HisRS de GCN2 activant sa fonction kinase. Les protéines GCN1 et GCN20, ainsi que la présence d'un domaine HisRS fonctionnel, sont d'ailleurs essentielles pour le bon fonctionnement de GCN2 au cours d'une carence en purine (Rolfes and Hinnebusch 1993; Yang *et al.* 2000). Cela

suggère que le mode d'activation de GCN2 est similaire à celui qui intervient à la suite d'une carence en acide aminés.

c. Carence en glucose.

La phosphorylation d'eIF2 α par GCN2 peut aussi être induite à la suite d'une insuffisance en glucose (Yang, Wek and Wek 2000). Cet effet est transitoire et nécessite la présence d'un domaine HisRS fonctionnel (Yang, Wek and Wek 2000). Des ARNt libres seraient responsables de l'activation de la kinase au cours de ce stress. En effet, le pool d'acides aminés est fortement réduit durant une carence en glucose (Yang, Wek and Wek 2000). Cependant, un certain nombre de différences avec le cas de la carence en acides aminés sont observés. En effet le mutant GCN2 qui ne permet pas l'association au ribosome est capable d'induire un contrôle de la traduction à la suite d'une insuffisance en glucose contrairement à ce qui est observé à la suite d'une carence en acide aminés (Yang, Wek and Wek 2000). La protéine GCN20 n'est d'ailleurs pas essentielle pour le contrôle de la traduction à la suite d'une carence en glucose (Yang, Wek and Wek 2000). D'autre part, une étude a montré que la carence en glucose ne conduisait pas à l'activation de la transcription du gène HIS4, cible traditionnel du facteur de transcription GCN4 (Marbach *et al.* 2001). Cela suggère que la régulation et le contrôle de la traduction par la protéine GCN2 au cours d'une insuffisance en glucose ne fait pas intervenir exactement les mêmes voies que dans la réponse à une carence en acides aminés.

Une étude a montré que l'ajout de glucose dans le milieu de culture de levures cultivées en conditions de carence en glucose conduisait à l'accumulation du transcrit du gène HIS4, cible du facteur de transcription GCN4 dont la traduction est régulé par GCN2 (Marbach *et al.* 2001). Cette accumulation n'est pas la conséquence d'une activation de la traduction de GCN4 causée par augmentation supplémentaire de la phosphorylation du facteur eIF2 α , mais l'effet est tout de même dépendant de la présence des protéines GCN2 et GCN4 (Marbach *et al.* 2001). Ainsi, il est proposé que l'action de GCN2 dans ce processus passe par la phosphorylation ou la régulation d'un facteur encore inconnu. Il est aussi possible que GCN2 stimule l'activité de GCN4 sans pour autant induire la traduction de ce facteur. L'induction de la voie GCN4 en réponse à une carence en acide aminés permet une activation

de novo de la voie de synthèse des acides aminés. Il est envisageable que cette même voie est besoin d'être activée lorsque du glucose devient accessible à la suite d'une période de carence afin d'assurer les besoins en acides aminés et en nucléotides.

d. Stress salin.

Un niveau anormalement élevé en ions sodium (Na^+) conduit à la phosphorylation du facteur $\text{eIF2}\alpha$ par la kinase GCN2 (Goossens *et al.* 2001). Parallèlement, la réduction de la quantité en ions potassium (K^+) a pour conséquence l'activation de la transcription du facteur GCN4 (Narasimhan, Staschke and Wek 2004). D'autre part, l'ajout d'ions K^+ dans un milieu saturé en ion Na^+ inhibe l'activation de la voie GCN2 par les ions Na^+ . Cela suggère que c'est plutôt le rapport Na^+/K^+ qui régule la protéine GCN2 et non pas uniquement les ions Na^+ (Narasimhan, Staschke and Wek 2004). Un excès en ions Li^+ semble d'ailleurs également induire la phosphorylation d' $\text{eIF2}\alpha$ (Narasimhan, Staschke and Wek 2004).

La réponse au stress salin nécessite la présence d'un domaine HisRS fonctionnel suggérant qu'un déséquilibre en sel dans la cellule influe sur la quantité d'acides aminés et/ou d'ARNt disponibles. Ainsi, il a été rapporté que de fortes concentrations en ions Na^+ entraîne la diminution de l'import des acides aminés à l'intérieur des cellules (Pascual-Ahuir *et al.* 2001). Cependant, il faut noter que les études précédentes ont été réalisées avec un milieu supplémenté avec l'ensemble des acides aminés suggérant que ce n'est pas un défaut de synthèse en acide aminés qui est à l'origine de l'activation de GCN2. Un excès en ion sodium peut engendrer des changements au niveau de la machinerie de synthèse et de modification des ARNt (Smith 1969). Cela pourrait également avoir un effet négatif sur les ARNt-aminoacyl synthétases (Florentz *et al.* 1990). De manière générale, la variation des concentrations en ions modifie le potentiel électrique de la membrane cytoplasmique, lequel est impliqué dans de nombreux processus cellulaires, tels que le transport de nutriments et la compartementalisation à l'intérieur du cytoplasme (Blumwald *et al.* 2000, Saier 2000).

e. Impact de l'agent alkylant méthyl méthane sulfonate et de l'hydroxy-urée.

Une étude par microarray des gènes induits en réponse à une carence en acides aminés a montré que plus de 90 % des gènes dont l'expression est modifiée lors de ce stress voient également leur expression varier à la suite d'un traitement avec du méthyl méthane sulfonate (MMS) (Natarajan *et al.* 2001). Le MMS semble donc avoir un effet sur la voie de contrôle de la traduction par la protéine GCN2. Le MMS est en effet capable d'induire la traduction du facteur GCN4 uniquement en présence d'une protéine GCN2 possédant un domaine HisRS et pseudokinase intact (Natarajan, Meyer, Jackson, Slade, Roberts, Hinnebusch and Marton 2001). De manière similaire, l'hydroxyurée (HU), inhibiteur de la réplication et de la réparation de l'ADN est lui aussi capable d'induire l'expression de gènes régulés par le facteur GCN4 (Hughes *et al.* 2000). Le MMS et le HU sont effectivement capable d'induire la phosphorylation d'eIF2 α (Cherkasova and Hinnebusch 2003).

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées concernant l'effet du MMS sur la phosphorylation d'eIF2 α . D'abord, il est possible que le MMS interfère avec le processus d'aminacylation ce qui conduit à la production de ligands ARNt libres pour GCN2. La méthylation de GCN2 ou de l'un de ses régulateurs négatifs par le MMS pourrait également modifier l'affinité de GCN2 pour les ARNt.

Chez les mammifères, le MMS active la transcription du facteur GADD34 ce qui a pour conséquence d'activer la phosphatase PP1 (Haneda *et al.* 2004). PP1 étant responsable de la déphosphorylation d'eIF2 α , il est donc également envisageable que l'effet du MMS passe par le contrôle de la phosphatase d'eIF2 α et ne résulte donc pas de l'activation de GCN2 (Brush *et al.* 2003, Novoa *et al.* 2001).

f. Contrôle de GCN2 par les UV.

Chez *Schizosaccharomyces pombe*, le traitement par les UV entraîne la phosphorylation d'eIF2 α , mais la diminution générale de la traduction en réponse aux UV passe en partie seulement par la phosphorylation d'eIF2 α (Tvegard *et al.* 2007). De même, chez *Saccharomyces cerevisiae*, les UV activent la transcription des gènes de réponse à GCN4 sans induire la traduction de ce facteur par un mécanisme pourtant dépendant de

GCN2 (Engelberg *et al.* 1994, Marbach, Licht, Frohnmeier and Engelberg 2001). Cela confirme l'existence d'une voie de contrôle partiellement indépendante de certains acteurs traditionnels intervenant dans la voie GCN2-dépendante.

Une étude récente propose que, en plus de son rôle dans l'initiation de la traduction, le facteur eIF2 puisse avoir un rôle nucléaire la réparation de l'ADN (Ting *et al.* 1998; Lobo *et al.* 1997). En effet eIF2 interagit dans le noyau avec la protéine kinase dépendante de l'ADN, la DNA-PK. Cette kinase joue un rôle important dans le processus de réparation de l'ADN (Collis *et al.* 2005). La phosphorylation d'eIF2 α à la suite d'irradiation aux UV entraînerait l'activation d'un mécanisme de réparation de l'ADN.

g. *Le stress oxydatif.*

Le stress oxydatif causé par des espèces réactives oxygénées (peroxyde d'hydrogène), des agents oxydants (diamide) et les métaux lourds (cadmium) conduit à l'inhibition générale de la traduction (Mascarenhas *et al.* 2008, Shenton *et al.* 2006). L'effet répresseur sur la traduction passe en partie par la phosphorylation d'eIF2 α et nécessite la présence d'un domaine HisRS fonctionnel de GCN2 (Mascarenhas *et al.* 2008, Shenton *et al.* 2006). Le stress oxydatif activerait GCN2 en provoquant l'accumulation d'ARNt libres dans la cellule. Il est possible que le stress oxydatif affecte le transport ou le stockage des acides aminés dans la cellule. En effet, les acides aminés libres sont très sensibles à l'oxydation par des espèces réactives de l'oxygène, ce qui pourrait conduire à un déséquilibre de la balance acides aminés/ARNt dans la cellule (Stadtman and Levine 2003). De manière similaire, il est envisageable que les protéines et les acides nucléiques nécessaires au processus d'aminoacylation des ARNt soient sensibles à l'oxydation conduisant alors à l'accumulation d'ARNt libre.

Les organismes aérobies sont en permanence exposés au stress oxydatif. Ainsi, les cellules se sont adaptées en développant une réponse leur permettant de lutter efficacement contre ce stress. Pour cela, ils ralentissent la traduction générale et expriment de nombreux gènes codants des protéines à propriétés antioxydantes. De nombreux gènes sont activés de manière similaire à la suite d'un stress oxydatif ou d'une carence en acides aminés (Mascarenhas *et al.* 2008). La présence du facteur de transcription GCN4 est d'ailleurs

essentielle pour la survie de la levure en condition de stress oxydatif suggérant que parmi les gènes contrôlés par GCN4, certains d'entre eux interviennent dans la lutte contre les espèces réactives oxygénées (Mascarenhas *et al.* 2008).

h. Les anesthésiques.

Certains anesthésiques comme l'isoflurane et l'halothane provoquent la phosphorylation d'eIF2 α par GCN2 ce qui entraîne l'inhibition de la traduction (Palmer *et al.* 2005). L'effet de ces agents sur GCN2 passerait par la présence d'ARNt libres dans les cellules puisque le domaine de liaison à l'ARNt de GCN2 est nécessaire dans la réponse (Palmer *et al.* 2005). L'isoflurane conduit en effet à l'inhibition du transport des acides aminés dans les cellules ce qui conduit probablement à l'accumulation d'ARNt libres, ligands de GCN2 (Palmer *et al.* 2002).

II.1.3) Le contrôle de GCN2 par des protéines chaperones.

Un modèle de régulation de GCN2 par HSP90 a été proposé (Donze and Picard 1999). Ce modèle suggère que rapidement après la synthèse de GCN2, la chaperonne HSP90 et probablement d'autres chaperonnes viennent s'associer avec la kinase. Le complexe HSP90 permet ainsi de stabiliser la protéine sous une forme inactive mais prête à répondre à une éventuelle activation. Ainsi, au cours d'une carence en acide aminés, une molécule d'ARNt libre s'associe au domaine HisRS de GCN2 ce qui conduit à une modification conformationnelle laquelle provoque la libération de HSP90. GCN2 devient alors active, s'autophosphoryle et peut alors phosphoryler son substrat : eIF2 α .

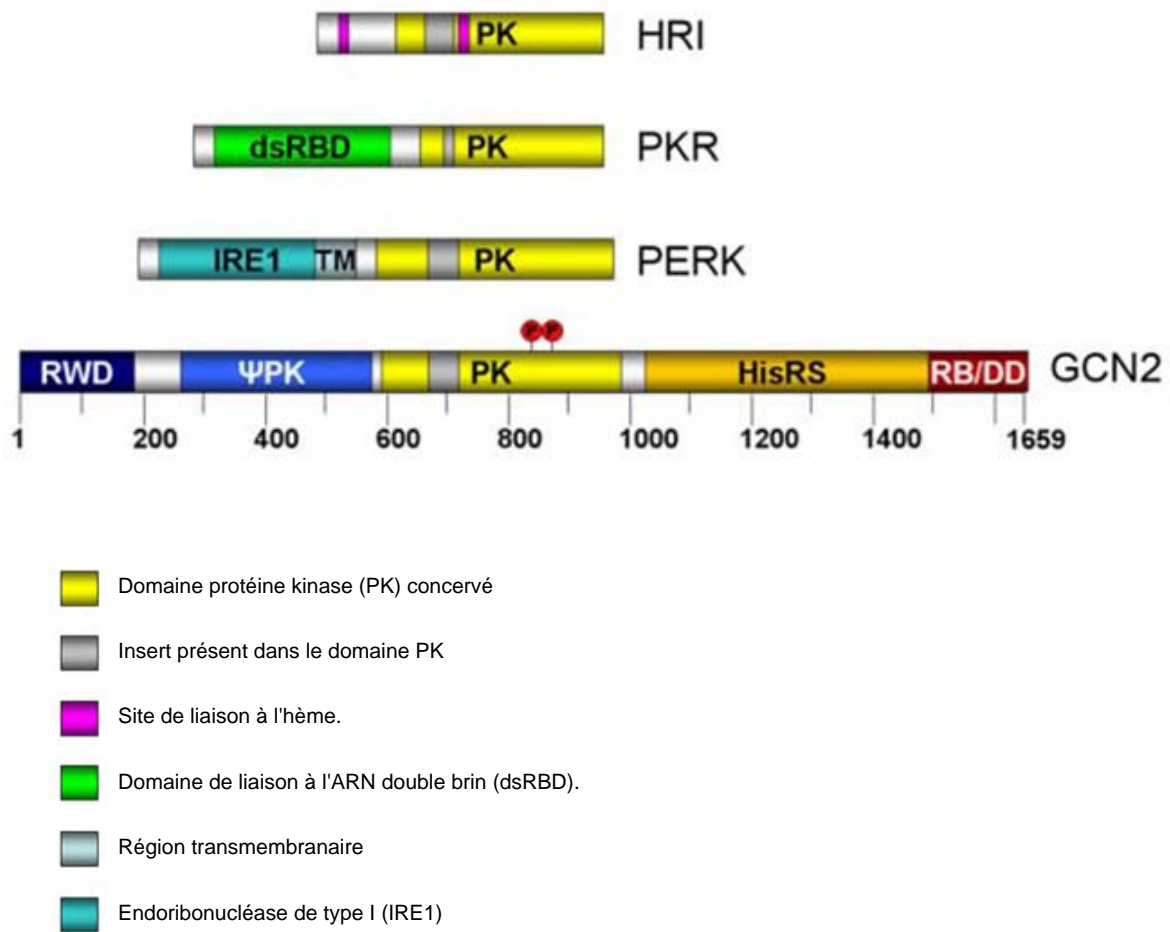


Figure 27: Les kinases d'eIF2α chez les mammifères.

II.2. Les autres kinases d'eIF2 α .

II.2.1) Chez les mammifères.

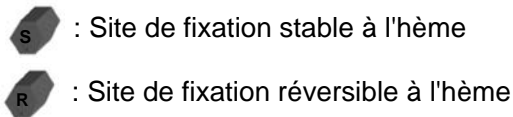
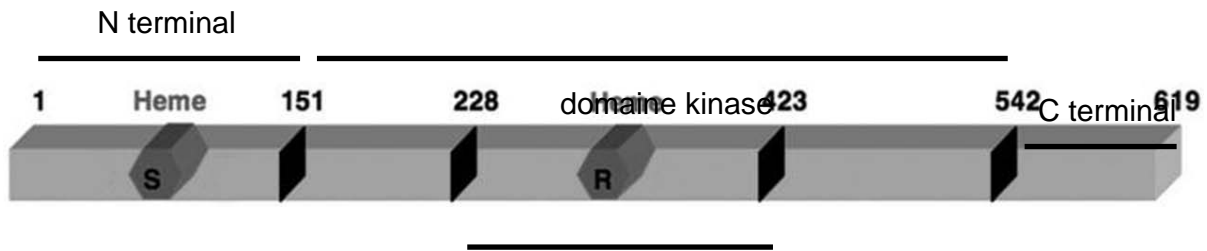
Chez les mammifères, on trouve en plus de GCN2, trois autres protéines kinases capables de phosphoryler eIF2 α : HRI, PERK et PKR (Figure 27). Elles possèdent toutes un domaine kinase conservé et sont capables de phosphoryler eIF2 α . HRI et PKR sont d'ailleurs capables de compléter la protéine GCN2 de levure dans son rôle de régulation de la traduction (Dever *et al.* 1993). Cependant, même si ces protéines ont un domaine kinase conservé, chacune possède des domaines régulateurs spécifiques qui leur permettent de répondre à différents stimuli. Ainsi les mammifères ont développé un mécanisme leur permettant d'inhiber la traduction par la phosphorylation d'eIF2 en réponse à un nombre de stress plus important que chez la levure en multipliant les kinases capable de phosphoryler ce substrat.

a. HRI

L'existence de la protéine kinase HRI (« Heme-Regulated Inhibitor of translation » eIF2 α kinase) a d'abord été mise en évidence dans des réticulocytes carencés en fer et en hème ce qui cause une inhibition de la synthèse protéique (Legon *et al.* 1973, Waxman and Rabinovitz 1965). HRI a ensuite été décrite comme une kinase d'eIF2 α régulée par l'hème et jouant un rôle clef dans la régulation de l'initiation de la traduction (Kramer *et al.* 1976, Levin *et al.* 1976).

Les érythrocytes sont constitués de grandes quantités d'hémoglobines qui leur permet de fixer les molécules de dioxygène. L'hémoglobine est une protéine constituée de trois composants : l' α -globine, la β globine et l'hème. Pour que la protéine soit fonctionnelle, il est impératif que la proportion de ces 3 composés soit très finement respectée. HRI permet donc un contrôle négatif de la synthèse de la globine en détectant la carence en hème. Ainsi, HRI empêche la traduction des globines α et β en excès par rapport à la quantité disponible d'hème. L'intérêt de la cellule à utiliser ce processus de contrôle général de la traduction peut d'abord être expliqué par le fait que dans ce type cellulaire fortement spécialisé, les ARNm codant pour les globines constituent les transcrits majoritaires et sont donc le substrat

A



B

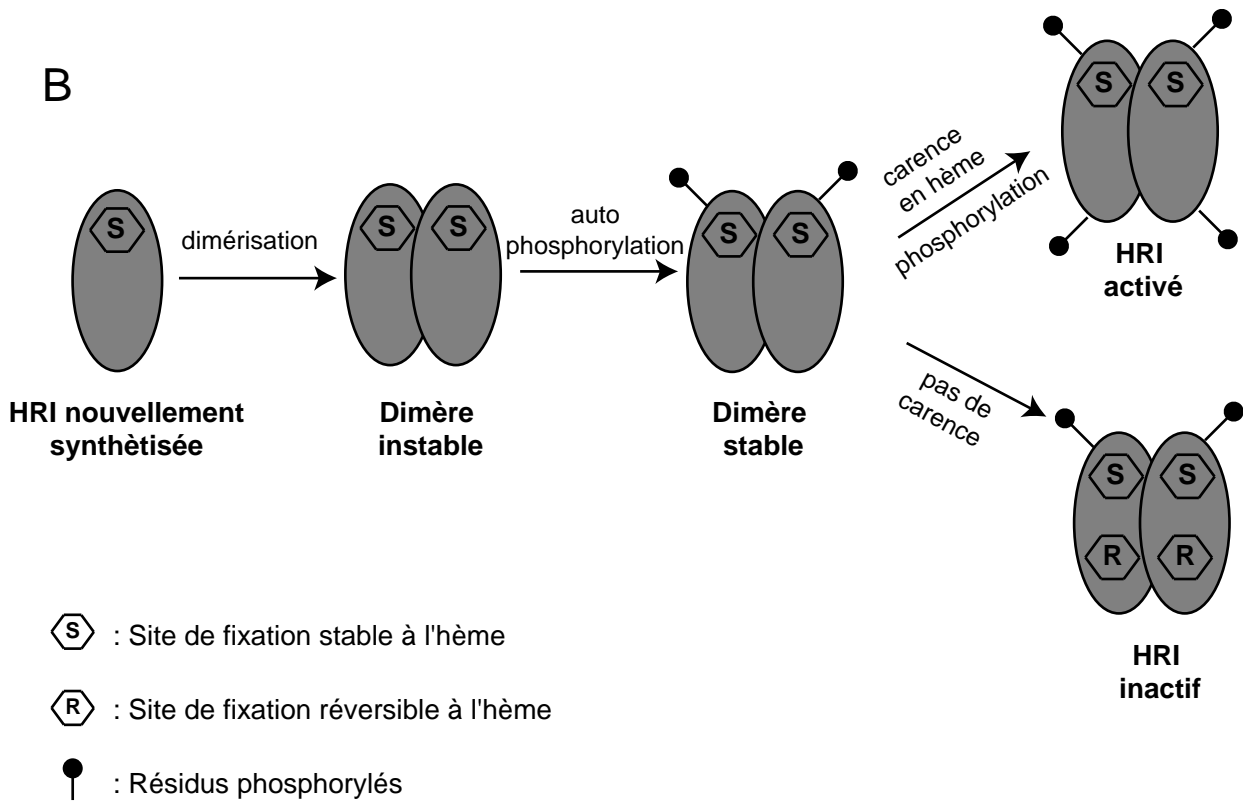


Figure 28: La protéine kinase HRI de mammifères.

A: Représentation schématique de la structure de la protéine HRI.
B: Régulation de l'activité kinase de HRI par la disponibilité en hème.

principal de la synthèse protéique (Han *et al.* 2001). D'ailleurs, la protéine HRI s'exprime fortement au niveau de la lignée érythroïde (Crosby *et al.* 1994).

HRI est constitué de 3 domaines distincts : un domaine amino-terminal, un domaine kinase séparé par un insert et un domaine carboxy-terminal (Figure 28). On trouve deux sites différents de fixation de l'hème : un site au niveau du domaine amino-terminal et un autre au niveau de l'insert du domaine kinase (Chefalo *et al.* 1998; Rafie-Kolpin *et al.* 2000).

Lorsque la protéine HRI est produite, elle s'associe d'abord avec une molécule d'hème au niveau de son domaine de liaison amino-terminal. Elle se dimérise alors rapidement et subit de nombreuses autophosphorylations qui permettent la stabilisation de la structure (Bauer *et al.* 2001). Lorsque l'hème est présent de manière abondante, il se fixe au niveau du domaine carboxy-terminal ce qui provoque une inhibition de l'activité kinase d'eIF2 α de la protéine (Rafie-Kolpin *et al.* 2000). En effet, la présence de l'hème empêche l'association de l'ATP avec HRI et bloque ainsi son activité kinase (Chen *et al.* 1991). A la suite d'une carence en hème, le second site de liaison reste libre, HRI est alors activé par un mécanisme d'autophosphorylation supplémentaire conduisant à l'activation de l'activité kinase (Lu *et al.* 2001) (Figure 28). HRI sous cette forme active n'est alors plus régulée par l'hème et ne peut-être inactivée que par dégradation protéolytique (Rafie-Kolpin *et al.* 2003).

Pendant longtemps on a pensé que la kinase HRI était spécifique des érythrocytes. Cependant, il s'avère que cette protéine est en fait exprimée beaucoup plus largement chez les mammifères (Mellor *et al.* 1994) (Berlanga *et al.* 1998). Il semble donc que la kinase HRI n'a pas seulement un rôle à jouer dans la formation des globules rouges mais aussi une fonction beaucoup plus générale au sein de l'organisme dans la réponse au stress oxydatif et au choc thermique (Lu, Han and Chen 2001) (Matts, 1993 #376).

b. La PERK.

Dans des cellules eucaryotes, le réticulum endoplasmique (RE) est le premier organelle dans la voie de sécrétion et de maturation des protéines. Dans le RE, les protéines se replient et subissent de nombreuses modifications telles que la glycosylation, la formation de ponts disulfures inter et intramoléculaire (Kornfeld and Kornfeld 1985; Fewell *et al.* 2001). Seuls les protéines correctement repliées seront exportées jusqu'à l'appareil de Golgi alors

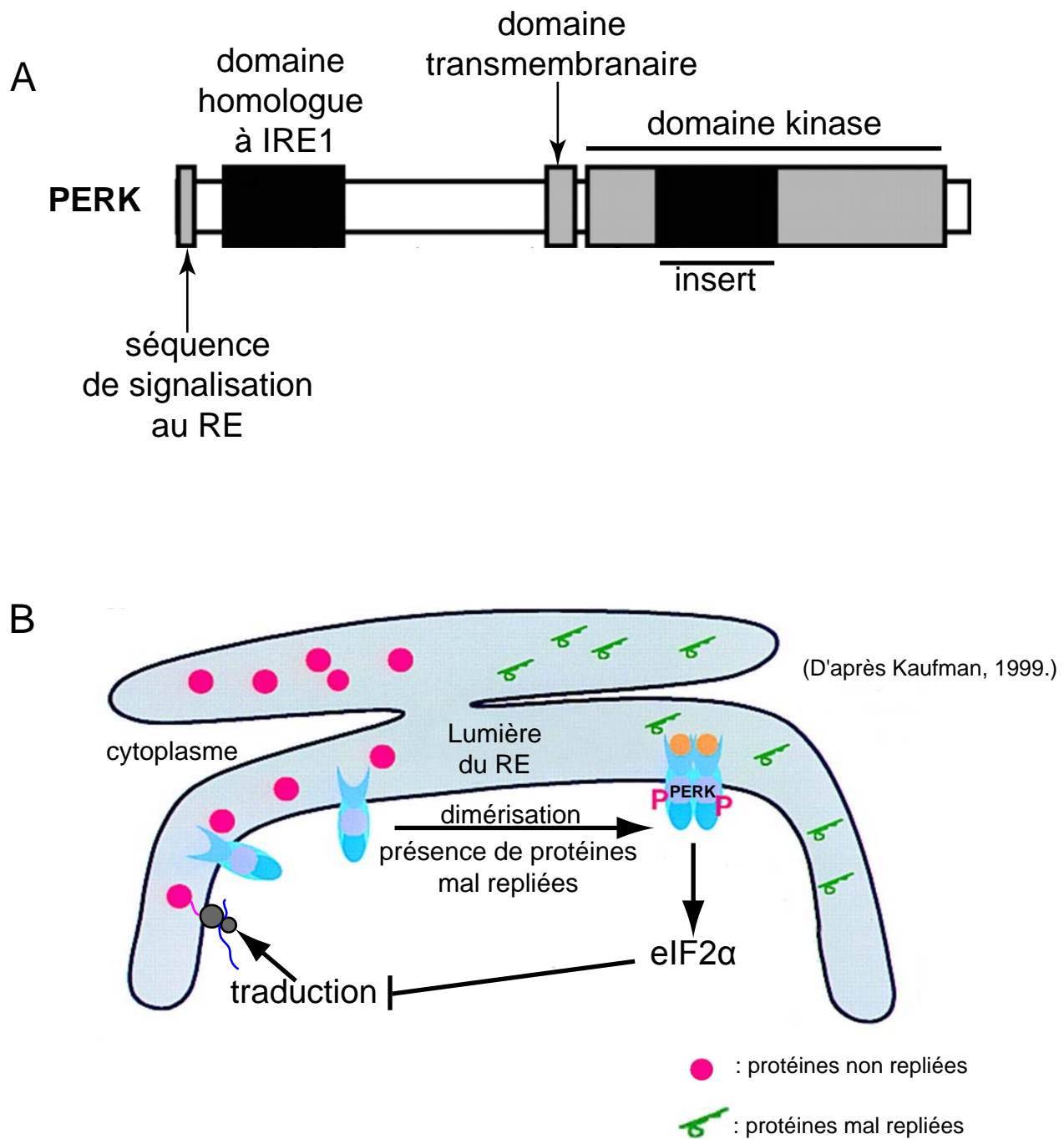


Figure 29: La protéine PERK de mammifères.

A: Représentation des différents domaines de la protéine PERK chez les mammifères.

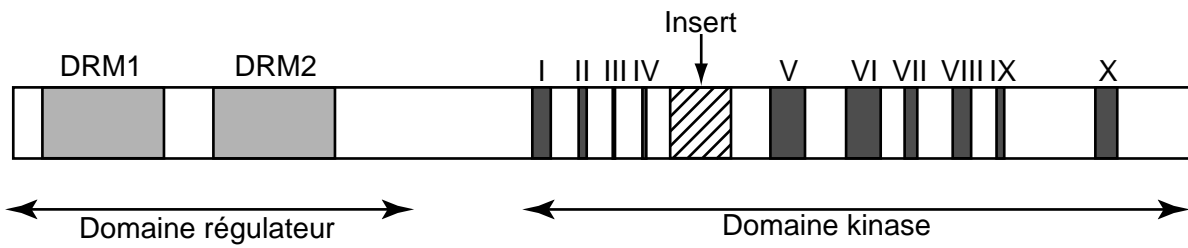
B: Régulation de l'activation de la PERK dans le réticulum endoplasmique.

que les protéines présentant des défauts de repliement seront retenues dans le RE afin de compléter leur maturation ou seront dégradées dans le cas contraire (Ellgaard *et al.* 1999). Ce processus de maturation est fortement régulé, pour cela, il fait intervenir de nombreux acteurs tels que des protéines chaperones, des molécules de signalisation ainsi qu'une machinerie de dégradation (Schroder and Kaufman 2005). Un problème lors du repliement des protéines ou une modification d'un processus à l'intérieur du RE est ressenti comme un état de stress, appelé stress du RE. De nombreuses pathologies neurologiques, certains diabètes et certaines formes de mucoviscidoses sont d'ailleurs associées à un mauvais fonctionnement du RE (Paschen 2003; Ozcan *et al.* 2004; Lukacs *et al.* 1994). Les cellules sont donc être capables de ressentir cet état afin de répondre de manière appropriée, c'est ce que l'on appelle la voie UPR (Unfolded Protein Response). Cette voie UPR est constituée de plusieurs mécanismes dont un consiste à inhiber la synthèse protéique ce qui permet de diminuer la quantité de protéines traversant le RE (Schroder and Kaufman 2005).

Récemment le lien entre le stress du RE et l'inhibition de l'initiation de la traduction par la phosphorylation du facteur eIF2 α a été mis en évidence (Harding *et al.* 1999). Il s'agit de la kinase PERK (Pancreatic ER Kinase ou PKR-like ER Kinase), protéine transmembranaire située au niveau de la paroi du RE. La PERK est essentielle pour la survie de la cellule durant la réponse UPR et elle est nécessaire pour assurer la fonction exocrine de certains organes (Harding *et al.* 2000b; Harding *et al.* 2001). La protéine PERK est en effet capable de phosphoryler le facteur eIF2 α à la suite d'un stress du RE (Shi *et al.* 1998; Harding *et al.* 2000a).

La PERK est constituée de plusieurs domaines lesquels seront en contact avec différents compartiments de la cellule (Figure 29). Le domaine amino-terminal est situé dans le lumen du RE alors que le domaine carboxy-terminal est présenté dans le cytoplasme. Au niveau amino-terminal on trouve d'abord une séquence de signalisation qui permet l'adressage de la protéine au RE. Ensuite la PERK possède un domaine homologue à la protéine IRE1, une autre protéine kinase spécifique du RE activée comme PERK à la suite du stress du RE (Harding, Zhang and Ron 1999; Liu *et al.* 2000). Ce domaine IRE1 est nécessaire pour la dimérisation de la protéine, processus indispensable pour obtenir une activité kinase fonctionnelle (Ma *et al.* 2002a). Le domaine amino-terminal de PERK permet aussi l'association avec des protéines chaperonnes du RE GRP78/BiP et GRP94 lesquelles interviennent dans la régulation de l'activité de la kinase (Ma, Vattam and Wek 2002a). Bip

A



B

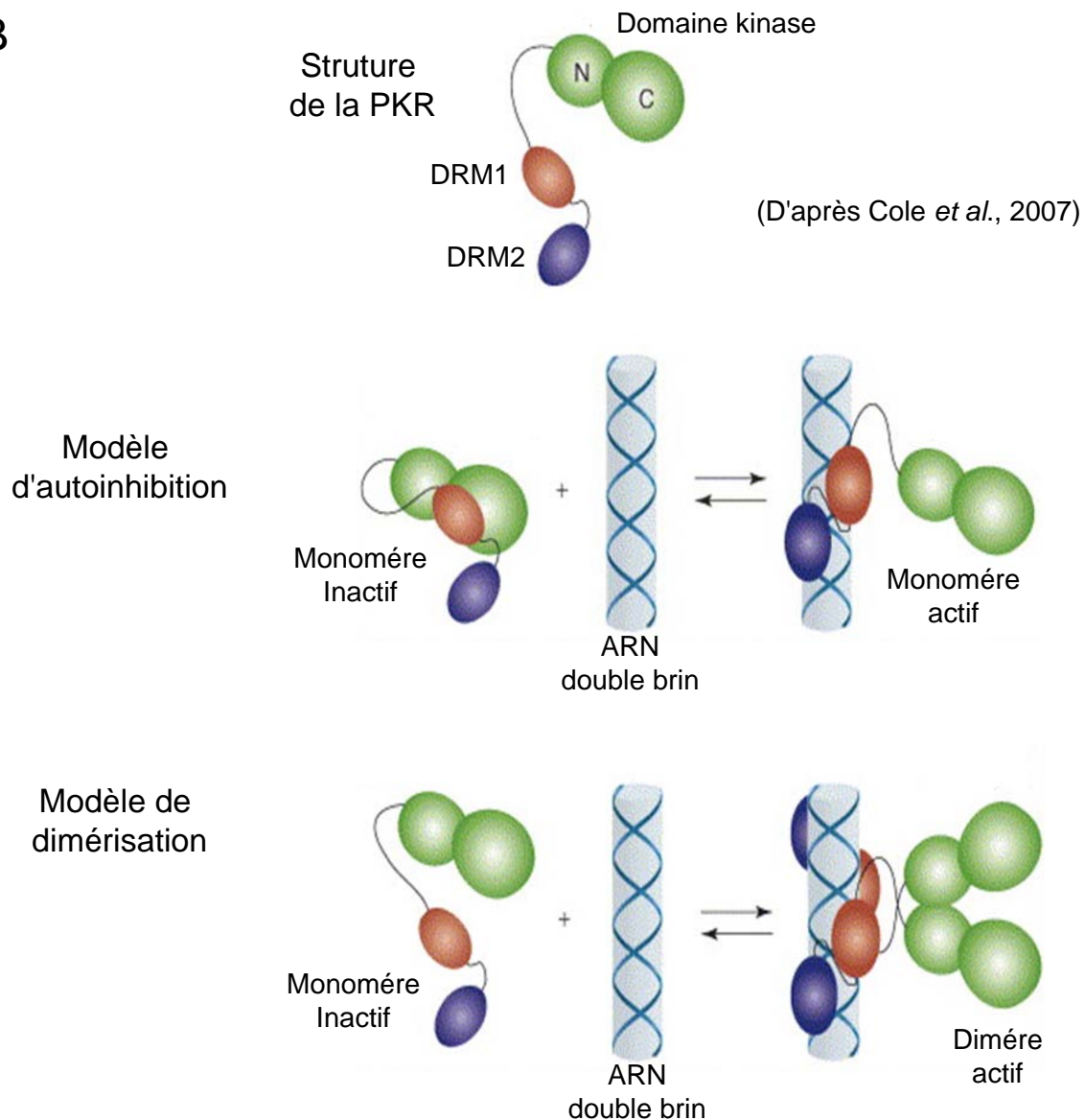


Figure 30: La protéine kinase PKR de mammifères.

A: Représentation de la structure de la PKR.

B: La régulation de l'activité de la PKR: le modèle d'autoinhibition et le modèle de dimérisation.

intervient d'ailleurs pendant le processus de repliement des protéines à l'intérieur du RE, la quantité de cette chaperonne augmente fortement à la suite de l'activation de la voie UPR afin d'augmenter les capacités de repliement à l'intérieur du RE (Kozutsumi *et al.* 1988). Au centre de la PERK se trouve le domaine transmembranaire lequel permet l'encrage de la protéine à travers la membrane du RE. Ensuite, situé dans le cytoplasme, on trouve le domaine kinase de la protéine. Cette région catalytique présente une structure conservée avec les autres kinases d'eIF2 α : un domaine kinase constitué de 11 sous-domaines caractéristiques des protéines à fonction kinases ainsi que les résidus conservés permettant la reconnaissance de son substrat, eIF2 α (Dar, Dever and Sicheri 2005, Sood *et al.* 2000).

Le processus d'activation de la PERK à la suite d'un stress du RE reste encore à être déterminé avec précision. Il est proposé que dans des conditions normales, la PERK serait maintenue sous la forme d'un monomère inactif par l'association avec la protéine chaperonne BiP (Bertolotti *et al.* 2000). A la suite d'un stress du RE, la chaperonne Bip se dissocierait de son partenaire ce qui permettrait à la PERK de se dimériser (Bertolotti *et al.* 2000, Ma, Vatter and Wek 2002a). La protéine pourrait alors s'autophosphoryler entraînant l'activation de son activité de phosphorylation d'eIF2 α (Harding, Zhang and Ron 1999; Bertolotti *et al.* 2000; Su *et al.* 2008) (Figure 29). Il est également envisageable que le domaine IRE1 de PERK permet la reconnaissance de régions hydrophobes présentées par les protéines mal repliées.

c. PKR

La PKR est constituée de deux grands domaines distincts : un domaine régulateur amino-terminal qui permet l'association à l'ARN double brin, et un domaine kinase situé au niveau carboxy-terminal (Figure 30). Le domaine de liaison à l'ARN double brin (DRM) contient deux motifs distincts de liaison à l'ARN d'une taille de 70 acides aminés environ (St Johnston *et al.* 1992) (Figure 30). Ces motifs sont riches en résidus basiques et sont séparés par un espaceur de 20 acides aminés très flexible permettant de positionner les deux motifs DRM de part et d'autre de la molécule d'ARN (Nanduri *et al.* 1998; Cole 2007). Le domaine kinase de PKR contient les sous-domaines kinases classiques ainsi qu'un insert entre les sous-domaines IV et V (Meurs *et al.* 1990) (Figure 30). La PKR possède enfin les résidus

conservés permettant la reconnaissance de son substrat, eIF2 α (Dar, Dever and Sicheri 2005, Sood *et al.* 2000) (Figure 23).

L'activation et l'inhibition de la PKR a lieu en réponses à différents agents tels que l'ARN double brin d'origine cellulaire ou virale, des composés polyanionique comme l'héparine ou des protéines virales. L'activation de la PKR conduit à la phosphorylation d'eIF2 α et par conséquent à une inhibition général de la traduction (Proud 1995). Ainsi, l'activation de la PKR par des ARN viraux constitue une première ligne de défense contre ces agents infectieux.

A ce jour, il existe deux modèles expliquant le mécanisme de régulation de la fonction kinase de la PKR (Cole 2007) (Figure 30). Le premier, appelé modèle d'autoinhibition, est basé sur l'effet de régulateur négatif du domaine amino-terminal. En effet, la délétion du domaine DRM provoque une activation constitutive de l'activité kinase de PKR (Wu and Kaufman 1997). Ainsi, en l'absence d'ARN double brin, le domaine DRM s'associerait avec le domaine kinase afin de bloquer son activité. L'association de l'ARN double brin provoquerait une modification de conformation de la protéine conduisant à l'activation de la fonction kinase. L'autre modèle se nomme modèle de dimérisation. Dans ce modèle, l'association de la PKR avec une molécule d'ARN double brin conduit à la dimérisation de la protéine. La dimérisation permettrait alors d'activer le domaine kinase de la PKR qui après une étape d'autophosphorylation deviendrait active dans son rôle de kinase d'eIF2 α (Lemaire *et al.* 2005). Ce modèle permet d'expliquer en partie la réponse biphasique de PKR en fonction de la quantité d'ARN (Farrell *et al.* 1977; Hunter *et al.* 1975). En effet, lorsqu'il est présent en faible concentration, une molécule d'ARN s'associe à un domaine DRM et permet alors la dimérisation de la PKR en s'associant avec son domaine DRM. Cependant, lorsqu'il est présent à de fortes concentrations chaque monomère de la PKR est associé avec son ARN ce qui empêche l'association de 2 monomère via la même molécule d'ARN (Kostura and Mathews 1989).

II.2.2) La situation chez *Schizosaccharomyces pombe*.

S. pombe possède, en plus d'une kinase GCN2 comme chez *S. cerevisiae*, deux homologues de la kinase HRI humaine : HRI1 et HRI2 (Zhan *et al.* 2002; Zhan *et al.* 2004). Ces kinases sont capables de phosphoryler eIF2 α en réponse aux chocs thermiques ou à un traitement à l'arsenite tout comme leur homologue mammifère (Zhan *et al.* 2002). Il semble donc que *S. pombe* ait développé un mécanisme supplémentaire de réponse pour d'autres types de stress. GCN2 et HRI semblent d'ailleurs avoir des rôles chevauchant dans la réponse à certains stress mais avec des cinétiques différentes (Zhan, Narasimhan and Wek 2004). Cependant, la phosphorylation d'eIF2 α chez *S. cerevisiae* induit la traduction spécifique du facteur de transcription GCN4. Chez les mammifères c'est le facteur de transcription ATF4 qui est produit. Ces facteurs de transcription permettent de stimuler l'expression de gènes clefs lesquels permettent de lutter efficacement contre le stress. Or, alors que des homologues de GCN4 ont été trouvés dans de nombreux champignons tel que *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans*, *S. pombe* ne possède pas de protéine homologue (Luo *et al.* 1995; Wanke *et al.* 1997; Pereira and Livi 1995). Il est possible que chez *S. pombe*, d'autres types de facteurs encore inconnus soient régulés à la suite de la phosphorylation d'eIF2 α , ou que la diminution de la traduction soit le seul mécanisme utilisé par cette levure pour économiser ses ressources en attendant la fin du stress cellulaire.

II.2.3) La situation chez les invertébrés.

Chez la drosophile, on trouve 2 kinases capables de phosphoryler eIF2 α : GCN2 et PERK (Santoyo *et al.* 1997; Olsen *et al.* 1998). La protéine PERK de drosophile semble avoir conservée les mêmes types de régulations que son homologue mammifère car elle est activée à la suite du stress du RE (Pomar *et al.* 2003). Le facteur eIF2 α est aussi phosphorylée à la suite d'un choc thermique (Duncan *et al.* 1995). *Caenorhabditis elegans* présente les mêmes caractéristiques avec la présence d'une GCN2 et d'une protéine PERK (Sood *et al.* 2000). Il semble donc que les invertébrés possèdent 2 kinases d'eIF2 α lesquels permettent de répondre à une variété de stress plus étendue que chez *S. cerevisiae* mais moins variés que chez les

mammifères. La drosophile possède d'ailleurs une protéine homologue d'ATF4 qui permettrait de réguler les gènes en réponse à la phosphorylation d'eIF2 α (Hewes *et al.* 2000).

II.3. Phosphorylation d'eIF2 alpha

Le facteur eIF2 est constitué de trois sous-unités appelées respectivement α , β et γ . Des ADNc codant pour chacune de ces sous-unités ont été clonés et séquencés chez de nombreuses espèces et les séquences prédites en acides aminés montrent un degré exceptionnel de conservation suggérant que ce facteur joue un rôle central dans la vie de la cellule (Ernst *et al.* 1987, Hannig *et al.* 1993, Pathak *et al.* 1988).

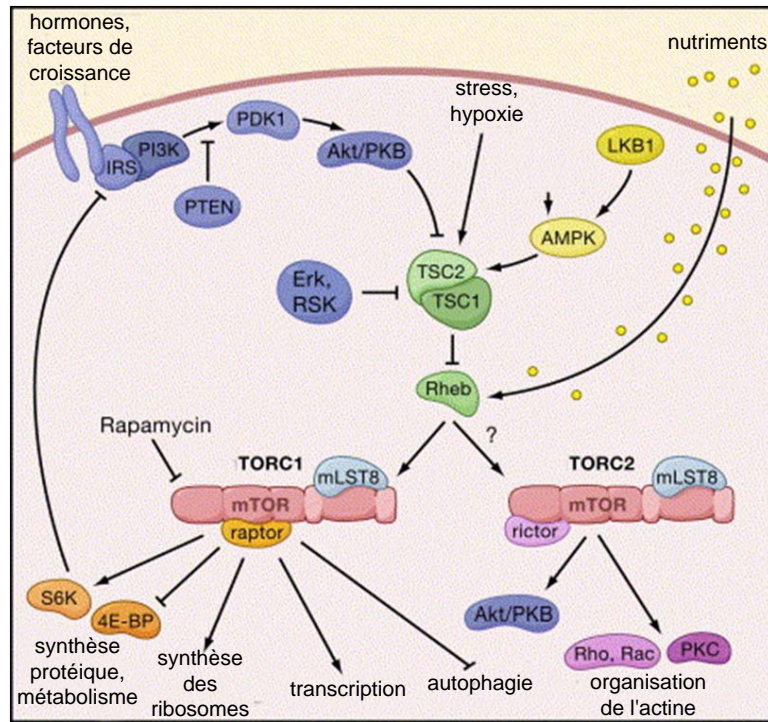
La sous-unité α d'eIF2 est constituée de 304 acides aminés chez la levure. La séquence en acide aminés ne présente pas de particularité hormis la présence d'un résidu Sérine en position 51, accepteur potentiel d'un groupement phosphate. D'ailleurs, la sous-unité α présente un niveau de conservation important entre les différentes espèces en particulier au niveau des résidus entourant cette sérine située à la position 51 (Figure 31) (Cigan *et al.* 1989).

La sous-unité β d'eIF2 est responsable de la liaison avec eIF2B, facteur de recyclage du GDP en GTP (Kimball *et al.* 1998). eIF2 β possède également un domaine de liaison au facteur eIF5, facteur responsable du processus d'hydrolyse du GTP en GDP, étape essentielle dans l'initiation de la traduction (Das *et al.* 1997).

eIF2 γ est quant à elle responsable de la liaison avec la molécule de GTP ou de GDP (Erickson *et al.* 1997, Naranda *et al.* 1995). Il est intéressant de noter qu'eIF2 possède une affinité bien plus grande pour le GDP que pour le GTP (Panniers *et al.* 1988). Le recyclage du GDP en GTP au niveau d'eIF2 nécessite donc la présence d'un processus actif. Enfin, avec la participation d'eIF2 β , eIF2 γ permet la liaison à l'ARNt méthionine aminocylé (Gaspar *et al.* 1994).

eIF2 joue un rôle clef au sein du complexe d'initiation de traduction. En effet, il est responsable du recrutement et du transfert de l'ARNt méthionine au niveau du codon initiateur (Moldave 1985). Pour cela, il forme un complexe ternaire avec une molécule de

A



(D'après Wullschleger *et al*, 2006)

B

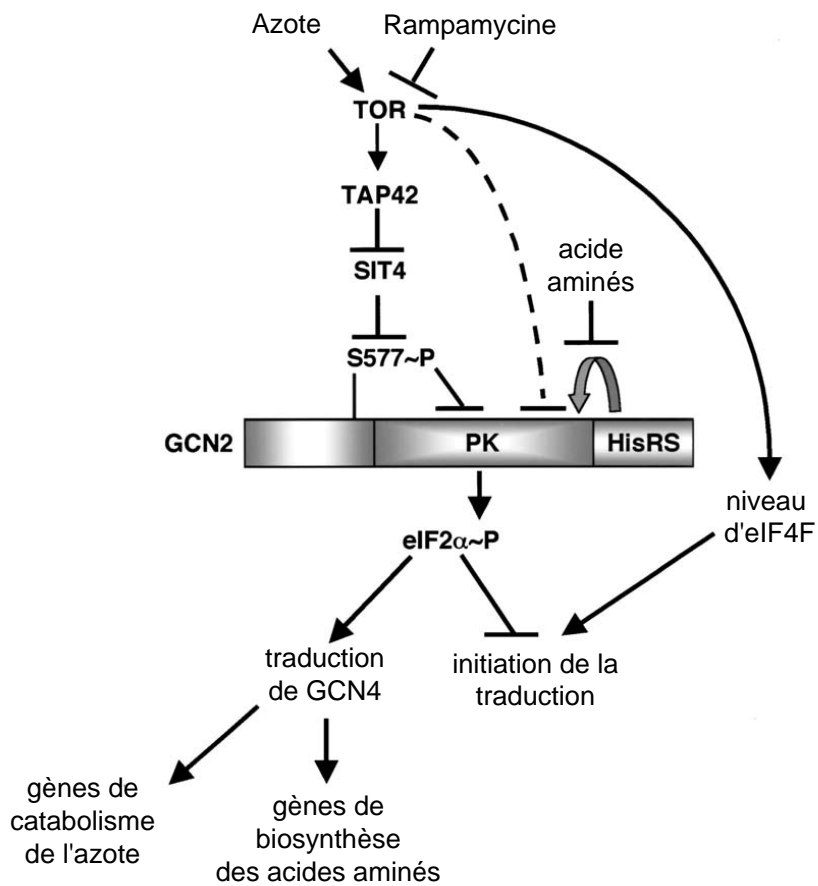


Figure 32: La voie TOR chez la levure.

A: La voie TOR et son contrôle dans la cellule.

B: Cross-talk entre la voie GCN2 et la voie TOR.

GTP et l'ARNt methionine amminoacylé. Ainsi, le contrôle de ce facteur permet de réguler la traduction dans la cellule.

II.4. Déphosphorylation d'eIF2 α .

La phosphorylation d'eIF2 α est un processus transitoire, en effet, une fois le stress terminé, la déphosphorylation de ce facteur a lieu très rapidement permettant ainsi de réactiver la traduction à l'intérieur de la cellule (De Benedetti and Baglioni 1985). Une activité phosphatase, responsable de la déphosphorylation d'eIF2 α a été purifiée (Crouch and Safer 1980). D'ailleurs, l'inhibition de la phosphatase PP1 conduit à l'augmentation du niveau de phosphorylation d'eIF2 α (Boyce *et al.* 2005). La présence d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif de la voie de contrôle de la traduction par eIF2 α a été mise en évidence chez les mammifères. Ainsi, lorsqu'eIF2 α est phosphorylé, la traduction du facteur de transcription ATF4 est spécifiquement activée (Harding *et al.* 2000a). ATF4 va alors induire l'expression du gène GADD34 (Ma and Hendershot 2003). Or, la protéine GADD34 est capable de s'associer avec la sous-unité catalytique de la phosphatase PP1 (Connor *et al.* 2001). GADD34, lorsqu'il est produit, va apporter PP1 au niveau du facteur eIF2 α qui va être déphosphorylé (Novoa *et al.* 2003; Novoa *et al.* 2001; Brush, Weiser and Shenolikar 2003). Ce mécanisme permet de limiter l'ampleur de la phosphorylation d'eIF2 α à la suite d'un stress, l'inhibition massive et continue de la traduction ne pouvant être que fatal pour la cellule.

II.5. La voie TOR et le contrôle de la phosphorylation d'eIF2 α chez la levure.

II.5.1) La voie TOR et le contrôle de la traduction.

La protéine TOR (Target Of Rapamycin) est une kinase de type Ser/Thr qui régule la croissance et le métabolisme de la cellule en réponse à de nombreux signaux environnementaux ainsi qu'à la rapamycine (Figure 32) (Wullschleger *et al.* 2006). Chez les levures et les eukaryotes supérieurs, un des rôles de la voie TOR consiste à activer la traduction à la suite de l'arrivée de nutriments dans la cellule (De Virgilio and Loewith 2006).

Pour cela, la protéine TOR, contenue dans un complexe multiprotéique appelé TORC1 régule la traduction *via* la protéine 4E-BP (eIF4E Binding Protein) (Figure 32) (Hay and Sonenberg 2004 ; Tee and Blenis 2005). En phosphorylant la protéine 4E-BP, TORC1 libère le facteur eIF4E avec lequel il était associé (Brunn *et al.* 1997). eIF4E libre peut alors s'associer avec eIF4G ce qui permet d'apporter l'ARNm jusqu'au ribosome et d'induire la traduction cap-dépendante (Gingras *et al.* 1999; Schalm and Blenis 2002, Schalm *et al.* 2003).

II.5.2) Cross-talk entre la voie GCN2/eIF2 α et la voie TOR

GCN2 possède de nombreux résidus phosphorylables dont certains sont essentiels pour le bon repliement et l'activation de la fonction kinase. Une étude réalisée chez la levure a mis en évidence l'importance de la phosphorylation du résidu sérine en position 577 dans la fonction kinase de la protéine (Garcia-Barrio *et al.* 2002) (Figure 32). En effet, la mutation de cette sérine conduit à la phosphorylation d'eIF2 α par GCN2 même dans des conditions normales. Il semble donc que la déphosphorylation de ce résidu sérine augmente l'affinité de GCN2 pour les ARNt libre ce qui explique l'activation de GCN2 dans des conditions normales où le niveau d'ARNt libre est faible. Il apparaît que dans des conditions normales, la sérine 577 est phosphorylée et que dans certaines conditions de stress, sa déphosphorylation conduise à l'activation de GCN2 en diminuant le seuil d'ARNt libre nécessaire à son activation.

Deux études récentes ont montré que la rapamycine stimule la phosphorylation d'eIF2 α par GCN2 (Cherkasova and Hinnebusch 2003; Kubota *et al.* 2003). Cette activation passe par la déphosphorylation de la sérine 577 de la protéine et nécessite la présence du facteur inhibiteur TAP42 (Cherkasova and Hinnebusch 2003). Or, la protéine TOR est capable de réguler négativement la phosphatase de type PP2A, SIT4, en facilitant son association avec TAP42 (Di Como and Arndt 1996; Beck and Hall 1999; Jacinto *et al.* 2001). Il est donc proposé que TOR est capable de réguler GCN2 en contrôlant la phosphatase qui serait responsable de sa déphosphorylation au niveau de la sérine 577 provoquant ainsi son activation (Figure 32).

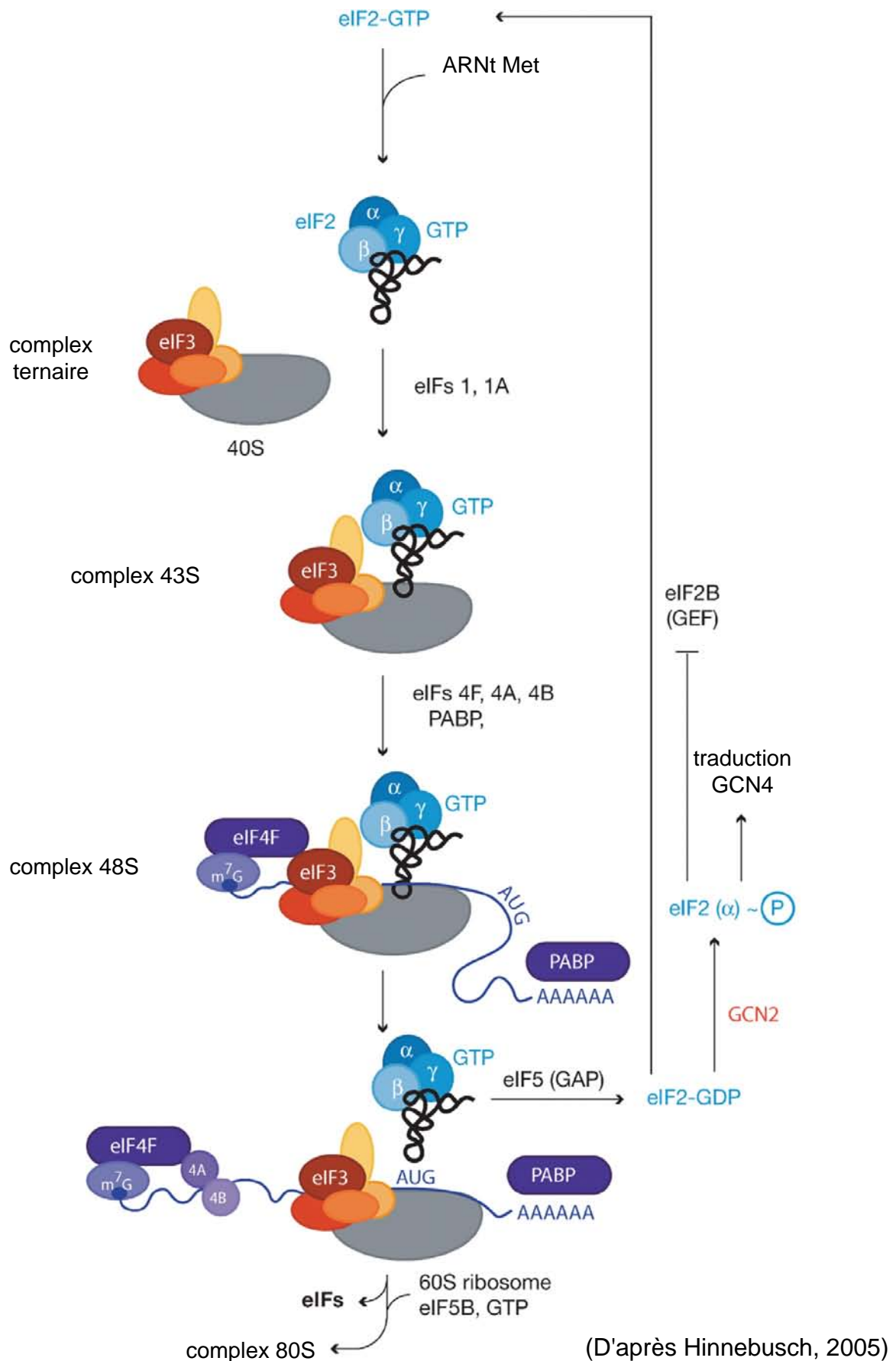


Figure 33: Initiation de la traduction chez les eucaryotes.

Le contrôle de la réinitiation de la traduction par la phosphorylation du facteur eIF2α est présenté à droite du schéma.

II.6. L'initiation de la traduction chez les eucaryotes et son contrôle par eIF2 α .

La réaction commence avec la liaison d'un couple ARNt-Méthionine avec la sous-unité 40S du ribosome afin de former le complexe d'initiation 43S (Figure 33). Le couple ARNt-Méthionine est transféré à la sous-unité 40S sous la forme d'un complexe ternaire (CT) avec le facteur eIF2 associé à une molécule de GTP. Une fois constitué, le complexe 43S va s'associer au complexe eIF4F qui est fixé à la coiffe situé en 5' de l'ARNm formant ainsi le complexe 48S. Ce complexe va alors parcourir l'ARNm jusqu'à trouver un codon AUG d'initiation de la traduction. L'anticodon situé au niveau de l'ARNt méthionine reconnaît alors le codon AUG ce qui va avoir pour conséquence l'hydrolyse du GTP en GDP par le facteur eIF5, la libération du couple eIF2-GDP et le recrutement de la sous-unité 60S du ribosome formant ainsi le complexe 80S capable de réaliser la synthèse protéique. Le couple eIF2-GDP relâché au cours de l'initiation de la traduction doit impérativement être recyclé en une forme eIF2-GTP pour pouvoir à nouveau former un complexe ternaire et permettre l'initiation de la traduction. Le remplacement du GDP par une molécule de GTP est réalisé par le facteur eIF2B et constitue l'étape limitante de la traduction. Lorsque la sous-unité α d'eIF2 est phosphorylée, le facteur eIF2B n'est plus capable d'échanger la molécule de GDP par une molécule de GTP (Rowlands *et al.* 1988). La phosphorylation d'eIF2 α conduit alors à une modification des affinités entre les différentes sous-unités d'eIF2 et eIF2B ce qui a pour conséquence de bloquer la fonction d'échange d'eIF2B (Krishnamoorthy *et al.* 2001). Ainsi la phosphorylation d'une fraction seulement des facteurs eIF2 α peut réduire fortement la synthèse protéique.

A

5'UTR ATCAAAACAAAACAAAACAAAACAACTCACACACAGGTTACTCTCCCCCTAAATTCAAATTTTTTTGCCCATCAGTTT
 CACTAGCGAATTATACAACCTACCAGCCACACAGCTCACTCATCTACTTCGCAATCAAACAAAATATTTTATTTTAGTTCAGTTTAT
 TAAGTTATTATCAGTATCGTATTAAAAAATTAAAGATCATTGAAAAATGGCTTGCTAAACCGATTATATTTTGTTTTAAAGTAGATT
 ATTATTAGAAAATTATTAAGAGAATTATGTGTTAAATTATTGAAAGAGAAAATTTATTTCCCTTATTAATTAAGTCCTTTACTTT
 TTTTGAAAACGTGTCAGTTTTTTGAAGAGTTATTGTTTTGTTACCAATTGCTATCATGTACCGTAGAATTTTATTCAAGATGTTTCC
GTAACGGTTACCTTTCTGTCAAATTATCCAGGTTTACTCGCCAATAAAAAATTTCCCTATACTATCATTAATTAATCATTATTATTAC
 TAAAGTTTTGTTTACCAATTGTCTGCTCAAGAAAATAAATAAATAACAATAAAATGCCGAATATCAGC **GCN4** ---

B

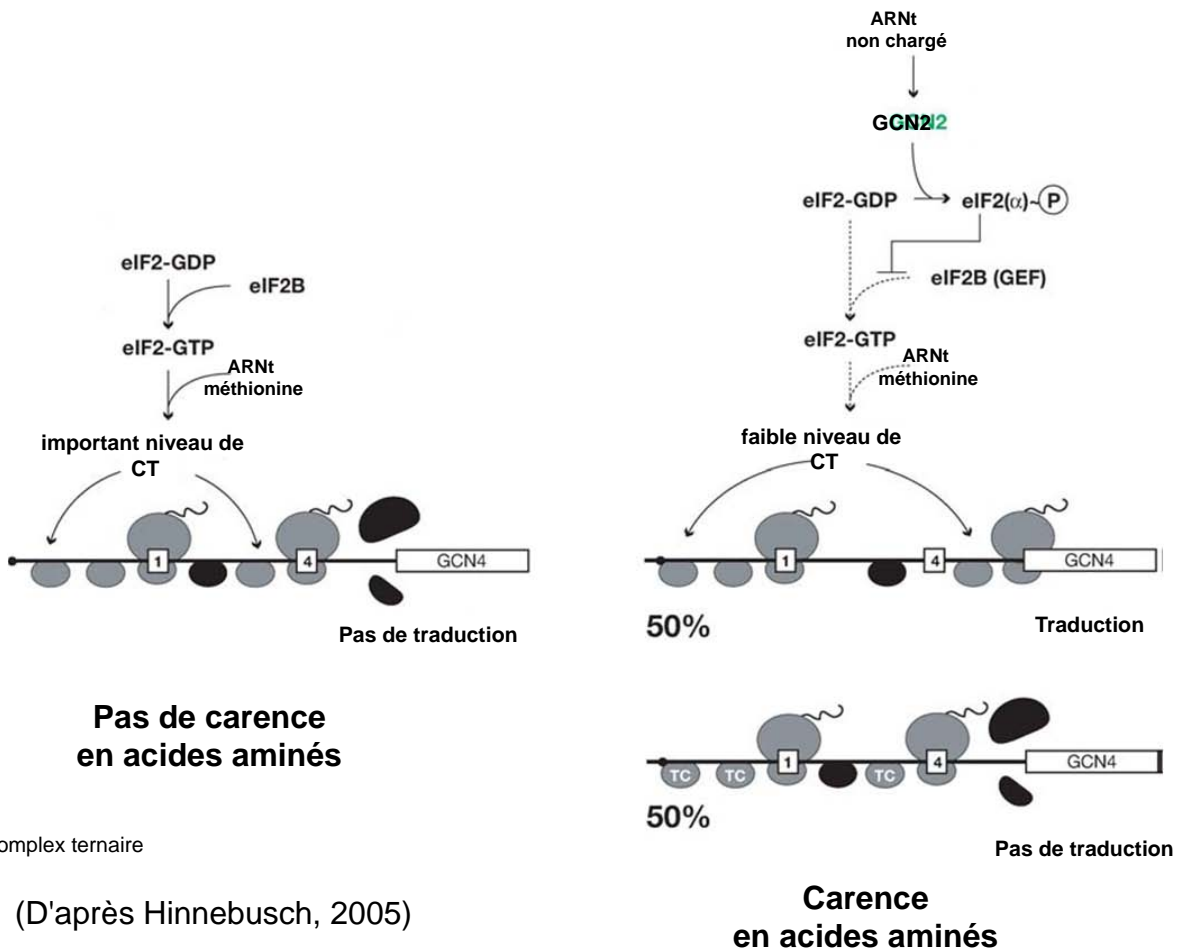


Figure 34: La régulation de la traduction du facteur GCN4.

- A: Séquence de la région 5'UTR du transcrit de GCN4. Les uORF sont indiqués. Le codon ATG responsable de la traduction de la protéine est entouré.
- B: Régulation de la traduction de GCN4 en fonction de la disponibilité en acides aminés.

II.7. La phosphorylation d'eIF2 α conduit à l'augmentation spécifique de la traduction de certains facteurs de transcription.

II.7.1) Chez la levure.

a. GCN4.

La régulation de la traduction du facteur GCN4 fait intervenir 4 courts cadres de lecture ouverts également appelé uORF (upstream open reading frame) présent au niveau de son ARNm en amont de son véritable codon initiateur (Figure 34). Le premier uORF (uORF1) et le dernier (uORF4) sont suffisants pour assurer le contrôle traductionnel de GCN4 (Mueller and Hinnebusch 1986). La présence de ces uORFs est essentielle pour la régulation de la traduction de GCN4. En effet, la mutation ou la délétion de ces uORF conduit à la dérepression constitutive de GCN4 (Hinnebusch 1984, Mueller and Hinnebusch 1986, Thireos *et al.* 1984).

La première étape de cette régulation est la fixation de la sous-unité 40S du ribosome associé au complexe ternaire eIF2.ARNt.Met.GTP au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNm de GCN4 (Figure 34). Ce complexe 48S commence à parcourir l'ARN jusqu'à arriver au niveau du premier uORF : uORF1. A ce moment précis, il recrute la sous-unité 60S et initie une première fois la traduction jusqu'au codon stop du uORF1 où la grosse sous-unité du ribosome se dissocie de même que le complexe eIF2/ARNt/Met/GDP. uORF1 est considéré comme une faible barrière traductionnelle. En effet, après la traduction du uORF1, la sous-unité 40S du ribosome reste généralement associée à l'ARNm et continue de parcourir le transcrit. Les uORF fonctionnent donc comme des barrières dans des conditions non carencées en acides aminés car la réinitiation de la traduction après un uORF est inefficace chez les eucaryotes (Rosenberg and Paterson 1979). En effet, le facteur eIF2 α n'étant pas phosphorylé les complexes ARNt.Met.GTP sont présents en grande quantité. Ainsi, après le passage du premier uORF, la plupart des sous-unités 40S se réassocient avec un nouveau complexe ternaire avant d'atteindre les uORF 2, 3 ou 4. La traduction peut être alors réinitiée au niveau de ces uORFs. Au niveau du codon stop du uORF4, on trouve des séquences riches en GC qui conduisent à la dissociation du ribosome et de l'ARNm (Grant and Hinnebusch 1994). Ainsi, lorsque le uORF4 est traduit, une éventuelle réinitiation de la traduction au niveau du codon initiateur de GCN4 devient impossible.

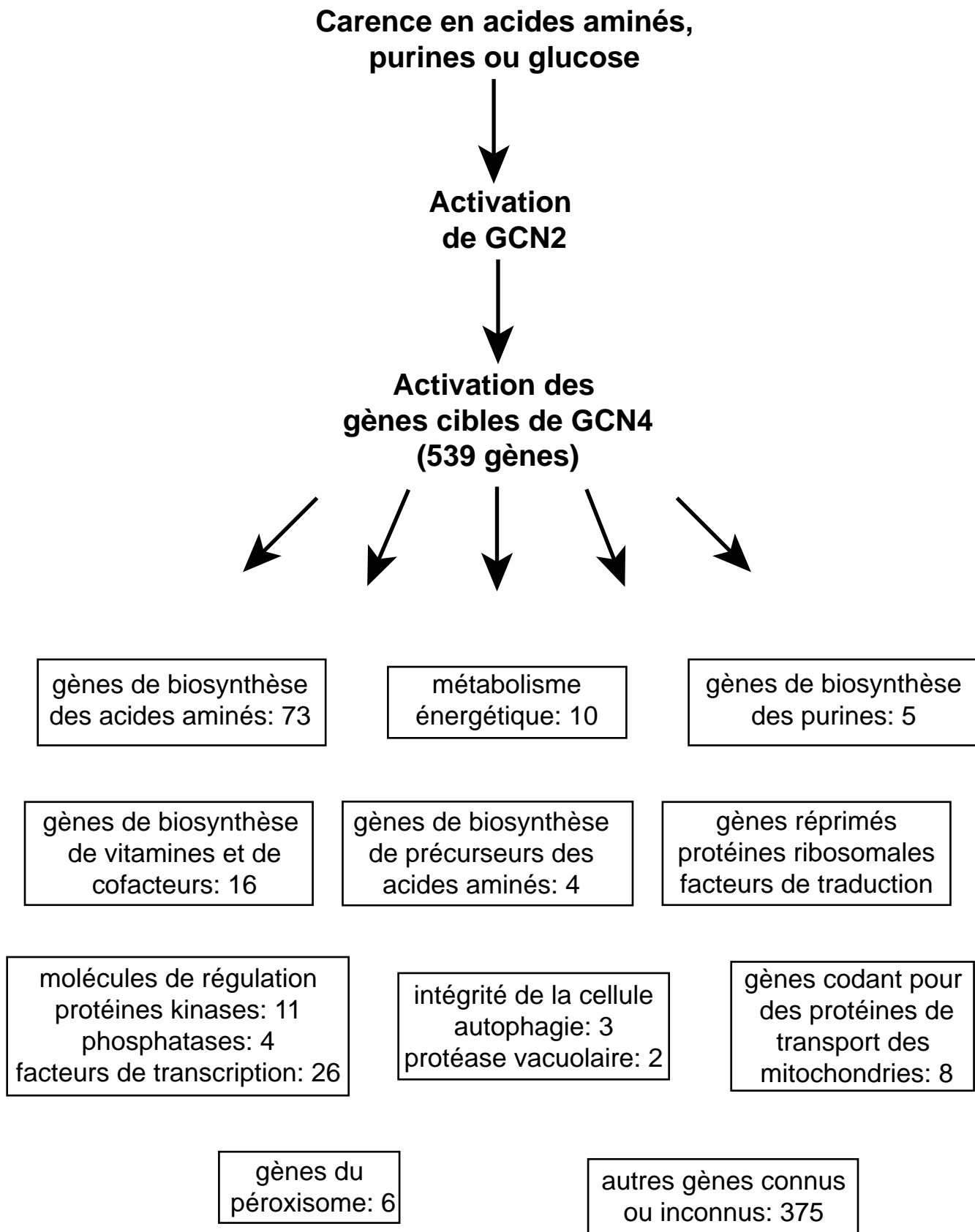


Figure 35: Les gènes cibles de GCN4.

(D'après Natarajan *et al*, 2001)

En condition de stress, lorsqu'eIF2 α est phosphorylé, la traduction des uORF de l'ARNm de GCN4 est fortement modifiée à cause de la faible quantité de complexes eIF2.ARNt.Met.GTP disponible. En effet, après initiation au niveau du premier uORF, la traduction ne peut pas être réinitiée au niveau des AUG des uORF en aval à cause du manque de complexes ternaires. L'absence d'un ARNt méthionine empêche la reconnaissance des codons AUG des uORF 2 à 4 (Cigan *et al.* 1988). Ainsi, plus de 50% des sous-unités 40S passent à travers les uORF 2, 3 et 4 sans se réassocier avec un nouveau complexe eIF2.ARNt.Met.GTP. La sous-unité 40S reste donc associée à l'ARNm et le codon initiateur de GCN4 peut alors être atteint et si un complexe ternaire est disponible, la traduction peut s'initier à nouveau et la protéine GCN4 peut ainsi être traduite (Abastado *et al.* 1991, Dever *et al.* 1992) (Figure 34).

b. Les gènes cibles de GCN4.

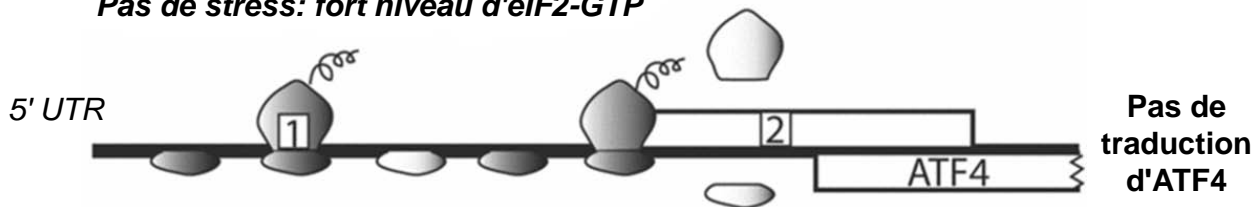
GCN4 appartient à la famille des facteurs de transcription de type bZIP (basic leucine Zipper) qui sont des protéines de liaison à l'ADN constitués d'une région basique permettant de lier l'ADN et d'un domaine de dimérisation aussi appelé « leucine zipper » (Landschulz *et al.* 1988). GCN4 s'associe à l'ADN sous forme de dimère au niveau d'une séquence constituée d'une répétition inverse de type ATGA(C/G)TCAT (Hinnebusch and Fink 1983; Hill *et al.* 1986; Hope and Struhl 1987).

Ces dernières années, des études d'expression par microarray ont révélé que la régulation des gènes intervenant dans la biosynthèse des acides aminés était seulement une des multiples fonctions de GCN4 (Jia *et al.* 2000; Natarajan, *et al.* 2001). En effet, ces études ont montré que ce facteur de transcription intervient dans la régulation de l'expression de plus de 500 gènes chez *S. cerevisiae* (Figure 35). Ainsi près de 10% des gènes de levure semblent être contrôlés par GCN4.

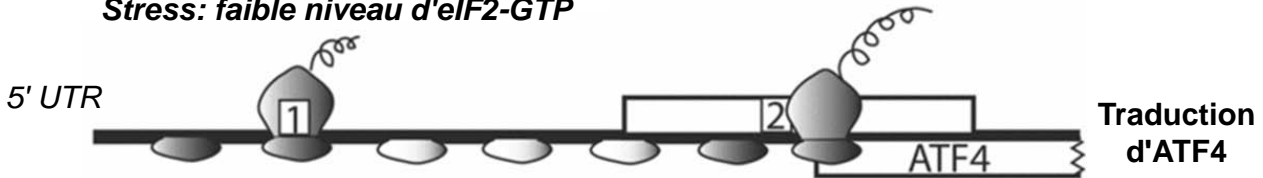
GCN4 induit l'expression d'au moins 73 gènes intervenant dans les voies de synthèse de tous des acides aminés ou de ces précurseurs. Au sein d'une même voie, plusieurs gènes sont souvent activés. Ainsi, induction des enzymes clefs de ces voies de biosynthèse permet de maintenir un niveau élevé d'ARNt aminoacylés dans la cellule.

A

Pas de stress: fort niveau d'eIF2-GTP



Stress: faible niveau d'eIF2-GTP



1 : uORF1

2 : uORF2

ATF4 : ORF d'ATF4

(D'après Wek *et al*, 2006)

B

Nom Description

Traduction/ métabolisme et transport des acides aminés

Myd116	eIF2alpha phosphatase, mouse GADD34
Abct2	ATP-binding cassette, sub-family F2, (GCN20)
Asns	asparagine synthetase
Mthfr	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
Slc1a4	glutamate/neutral amino acids transporter
Sars1	seryl-aminoacyl-tRNA synthetase 1
Cars	cysteinyl-tRNA synthetase
SYTC	threonyl-tRNA synthetase
Rps6ka2	ribosomal protein S6 kinase, 90kD, polypeptide 2
Lars	leucyl-tRNA synthetase
Eprs	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase
Pycs	pyrroline-5-carboxylate synthetase
Nars	asparaginyl-tRNA synthetase
WRS	alpha-2 subunit; tryptophanyl-tRNA synthetase
Aars	alanine-tRNA synthetase
Eif4ebp1	eIF4E binding protein 1
EST	phosphoserine phosphatase homologue
Yars	tyrosyl-tRNA synthetase
Elp3	elongation protein 3 homolog (S. cerevisiae)
EST	isoleucyl-tRNA synthetase
Slc1a7	neutral amino acid transporter, ASCT2
Shmt2	serine hydroxymethyl transferase 2

Réponse au stress

EST	UVRAG homologue, UV radiation resistance
Gch	GTP cyclohydrolase 1
GADD45	Mus musculus GADD45 protein (gadd45) gene
Ndr1	N-myc downstream regulated 1
Sqstm1	sequestosome 1; A170, STAP
Amt3	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
DnaJb9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9
Tboe	tubulin-specific chaperone e
Clcn3	chloride channel 3
Dnajc3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3, p58

Nom Description

Rédox et détoxification

Pon2	paraoxonase 2; esterase; anti-lipid oxidation
B5R.1	NADH-cytochrome B5 reductase
EST	thioredoxin-like protein HT014 homologue
Txnip	thioredoxin interacting protein
Cpo	coproporphyrinogen oxidase

Dégradation des protéines

Siah2	seven in absentia 2; ubiquitin ligase
Fbxo8	f-box only protein 8
Ctsc	cathepsin C

Voie de sécrétion

Wfs1	Wolfram syndrome 1 homolog, ER localized
Spaf	transitional endoplasmic reticulum ATPase
Herpud1	homocysteine-inducible-ubiquitin-like domain 1
Ero1l	endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-like
Sel1h	Sel1 (suppressor of lin-12) 1 homologue
ERO1Lb	endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-like-beta

Transcription

Atf3	activating transcription factor 3
Nrbf1	nuclear receptor binding factor 1
Nfkb2	nuclear factor of kappa B cell 2
Atf5	activating transcription factor 5
Chop-10	transcription factor CHOP, GADD153
Nupr1	nuclear protein 1
Cebpg	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma
Relb	(v-rel) oncogene related B
Tbpl1	TATA box binding protein-like 1
Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
Cbx4	chromobox homolog 4, transcriptional repressor
SKIP	Ski-interacting protein, nuclear receptor coactivator
ATF6	ATF6 alpha homologue
Atf4	activating transcription factor 4
Nfil3; E4BP4	NFIL3/E4BP4 transcription factor
Lmo4	LIM only 4; transcriptional regulator cofactor
Klf4	Kruppel-like factor 4 (gut)
Xbp1	X-box binding protein 1
Ets2	E26 avian leukemia oncogene 2, 3' domain
Rxrip110	retinoid X receptor interacting protein 110

(D'après Lu *et al*, 2004)

Figure 36: Le facteur de transcription ATF4.

A: La régulation de la traduction d'ATF4.

B: Les gènes cibles d'ATF4

GCN4 régule également l'activité de gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des purines. L'induction de ces enzymes par GCN4 pourrait être une stratégie pour soutenir la synthèse en histidine puisque l'ATP produit par la cellule est partiellement utilisé dans le processus de fabrication de l'histidine.

De nombreux autres gènes possédant des fonctions très diverses se trouvent aussi régulés par le facteur de transcription GCN4. Ainsi, on trouve des gènes codant pour des protéines intervenant dans des voies de biosynthèse de certaines vitamines, des protéines de transport mitochondrial, des composants du peroxysome, des protéines kinases, des phosphatases et des facteurs de transcription. D'autre part plus de 350 gènes contrôlés par GCN4 ont des fonctions qui sont encore à déterminer. Cela montre bien que GCN4 est un facteur de transcription central chez la levure qui permet d'activer ou de réprimer des processus biologiques très différents.

II.7.2) Chez les mammifères.

a. Le facteur de transcription ATF4.

Chez les mammifères, la phosphorylation d'eIF2 α conduit à une diminution globale de la traduction mais favorise parallèlement la traduction d'un facteur de transcription, ATF4 (activating transcription factor 4) (Harding *et al.* 2000a). Chez la souris, la régulation traductionnelle d'ATF4 fait intervenir 2 uORF situés au niveau 5' de l'ARNm lesquels facilitent la traduction de ce facteur de transcription lorsque eIF2 α est phosphorylée (Lu *et al.* 2004a) (Figure 36). Le uORF1 encode un polypeptide de seulement 3 acides aminés alors que le uORF2 est constitué de 59 résidus et chevauche partiellement la séquence codante d'ATF4 (Figure 36). Chacun de ces 2 uORF a un rôle particulier à jouer dans la régulation de l'expression d'ATF4 (Vattem and Wek 2004). Le uORF1 joue un rôle positif en facilitant le balayage du ribosome et la re-initiation de la traduction en aval. En effet, après la traduction de l'uORF1, la petite sous-unité 40S du ribosome reste associée à l'ARNm et continue de parcourir l'ARN. Dans des conditions normales de croissance, le facteur eIF2 α n'est pas phosphorylé et des complexes ARNt-Met-GTP sont présents en grande quantité. Ainsi la sous-unité 40S peut s'associer rapidement avec le complexe ternaire eIF2-GTP-ARNt-Met ainsi qu'à la sous-unité 60S. La réinitiation de la traduction peut alors se faire au niveau de la

séquence codante suivante : le uORF2. La traduction de ce second uORF empêche alors l'expression d'ATF4 car lorsque le ribosome traduit uORF2 il ne peut pas initier la traduction au niveau de l'ATG d'ATF4 et se dissocie de l'ARNm. Lorsque les cellules sont exposées à un stress qui conduit à l'augmentation de la phosphorylation du facteur de traduction eIF2 α , le niveau d'eIF2 associé à une molécule de GTP est alors fortement diminué. Ainsi, après la traduction du uORF1, il faut beaucoup plus de temps pour recruter le complexe ternaire au niveau de la sous-unité 40S du ribosome. La ré-initiation de la traduction ne se fait plus aussi efficacement au niveau de l'uORF2 et les ribosomes continuent donc de parcourir l'ARNm et peuvent ainsi initier la traduction qu'au niveau de la séquence codante d'ATF4.

b. Les gènes cibles d'ATF4.

ATF4 appartient à la sous-famille des facteurs ATF (Activating Transcription Factors) qui font partie de la famille des facteurs bZIP. ATF4 s'associe à l'ADN sous la forme d'un homodimère ou d'un hétérodimère avec un membre de la famille bZIP (Hai and Curran 1991; Vinson *et al.* 1993). Le site de liaison à l'ADN et l'effet activateur ou répresseur est déterminé par le partenaire d'hétérodimérisation (Podust *et al.* 2001; Yang *et al.* 2004; De Angelis *et al.* 2003). L'interaction avec ses partenaires semble être à la fois spécifique du type de tissu et du type de stress ce qui permettrait d'expliquer la réponse adaptative des mammifères à la suite d'une carence en acide aminés ou d'un stress UPR. Ainsi, en fonction du stress, les cibles d'ATF4 vont pouvoir être différentes.

ATF4 contrôle l'expression des gènes intervenant dans la production et le transport des acides aminés et de certains facteurs de transcription (Siu *et al.* 2002; Chen *et al.* 2004; Palii *et al.* 2006; Gjymishka *et al.* 2008; Lopez *et al.* 2007; Bruhat *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2004; Pan *et al.* 2007; Harding *et al.* 2000a; Ma *et al.* 2002b; Averous *et al.* 2004). Des expériences de microarray effectuées sur des lignées mutantes pour la PERK et/ou ATF4 et l'analyse de lignées cellulaires possédant une version non phosphorylable d'eIF2 α ont permis de mettre en évidence les gènes régulés par cette voie au cours du stress oxydatif et de la carence en acide aminés (Harding *et al.* 2003; Lu *et al.* 2004b). Ainsi, il semble qu'ATF4 contrôle l'expression de gènes intervenant à la fois dans l'import des acides aminés mais aussi

des gènes dont la fonction est de protéger les cellules du stress oxydatif (Figure 36). La voie de réponse à la phosphorylation d'eIF2 α chez les mammifères est donc multiple et complexe. Elle permet d'exprimer des gènes de manière spécifique en fonction du type de stress menant à l'activation des kinases d'eIF2 α .

Aucun gène intervenant directement dans la lutte contre une infection virale ne semble être activé à la suite de la phosphorylation d'eIF2 α . Il est possible que l'inhibition de la traduction soit la méthode utilisée par la voie eIF2 α au cours de ce stress.

III. Conservation de la voie eIF2 α /traduction dans le monde végétal.

III.1. Phosphorylation d'eIF2 α et initiation de la traduction chez les plantes.

Dans le monde végétal, la faible constante de dissociation d'eIF2 pour le GDP a longtemps laissé penser que les plantes n'utilisaient pas la phosphorylation d'eIF2 α comme moyen de régulation de la traduction (Shaikhin *et al.* 1992). Cependant, la protéine eIF2 α de blé est capable de compléter la fonction de son homologue levure. Ainsi, chez la levure, la protéine eIF2 α de blé peut être phosphorylé *in vivo* par GCN2 et régule la traduction de GCN4 de la même manière que la protéine d'origine (Chang *et al.* 1999; Chang *et al.* 2000). D'autre part, eIF2 α de blé est également phosphorylable par la PKR humaine et est capable d'interagir avec la machinerie de traduction des mammifères (Gil *et al.* 2000). La machinerie traductionnelle est conservée entre les plantes et les mammifères. De plus, la protéine eIF2 α des plantes peut être phosphorylé par des kinases de mammifère (Kawaguchi and Bailey-Serres 2002). Cela suggère qu'un mécanisme de contrôle de la traduction par eIF2 α existe aussi chez les végétaux.

Il est intéressant de noter que chez le blé la sous-unité α d'eIF2 est présente sous une forme hypophosphorylée dans les stades jeunes du développement de la graine. Ensuite eIF2 α est progressivement phosphorylée dans la graine mature et ne sera déphosphorylée que pendant la germination de la graine (Le *et al.* 1998). Ainsi il semble envisageable que la phosphorylation d'eIF2 α soit une des méthodes utilisées par la graine pour inhiber la traduction pendant la phase de latence.

A

arabidopsis MGRSSSKKKKKRGGSGRRGQKDHGSAEDNEELSEETASAIPOEDCKVSDSRS...PPOIAIKIRPYSK 71
levure SLSHLTLQYYEYOCNEBAIRSIYMDFTDTKRSSSWDKQPOIIFETLRSV 55

DMGYEDTTHSAMIIVRCIPGYPKPKQITPEGGTTADAERLLEDDQANSNARERVHIFNVEAAQEBLS 146
DK...EPVSSITLHFAMTEFMYPTAFEEFKNVNMDSQLQMLRS...EFKKIHNTSRQELIFETTSFTORLD 126

DI...PESHDESVPCLTAAHRSQTFE..... 171
EFQNVMTQSLDDRLQRIKETKEOEKEEREKQQETIKKRSDEQRRIDEIVQRELEKRDQDDDDLLFNRTTQLD 201

..... 171
LQPPSEVVASGEAIVFSKTIKAKLPNNSMFKFVAVNPKPIKLTSDIFSFKQFLVKPYIPPEPLADFLMSSEM 276

..... 171
MENFYLLSSELDNSYFNTSNGKKEIANLEKELETVLKAKHDNVNRLFGYTVERMGRNATFVVKIRLLTEYCN 351

..... QPMLSNIAKSCSGPPFYGFIDLFSG...EDARNMSLTEDENRGVSSVQSH 221
YYPLGDLIQSVGFVNLAIRIWMIRLEGEAIIHKL...IWHKCNLETVLVKQADFGSTIEK...LVYSTYGY 421

PDTSRRLHQKEDKRLKRFEDHAKEDALPAPAKRLNTVQEEVDDTSISFSDSSKSTDDVESGFONEKESNL 296
TV...LNLISRYENKNGSSVLESPSTWIA...PELKFNAKQPR...PDWQLGVLFQIIGSGDIVNFFETQEF 490

QDDAPEDSTNSESESLGSWSDSLACQVQPKSKKQLLVHLLRVACTSRGPLADALPQITDESHELGLISEEV 371
LDSMSM.....ETLYDLLSKMNNDPKKRGTLLELPKFLPT.....NDSTINRFNLVSESV 545

LDLASKSSPFDNRTFEHAFNQNASTSV.PQFWEPFSDSCEPNASLPSSRYLNDFEELKPLGGCGFGHVLCKNK 445
NSNSLELTPTGDTITVRNGGRTSQSSIRRRSFNVGSRFSSINPA.TRSRYASDFEEAVLGGCAFQGVVKARNA 619

LDGQYAKKKIRLKEKLPVNSRIETREVALSRQCHGVVRYVYQAMPFTGVVDP...FAGANWGSKTAGSS... 513
LDSRYVAKKKIRHTKEK...STHSEVMLASLNQYVRYVYAAWLEEDSMENVEESTDEESDLESSEDFEE 691

.....MRSVSG.....AVSTEIPEQNNLES..... 534
NDLLDQSSIFKNRTHDLDNSNWDFTSCSGYPDIVFENSSRDENEDLDHDTSTSSSESQDDTKSKSIQNV 766

.....TYLQIOMBYCP.RTLRQVFESYN.HFDNDFAHLLRQIVESGLAHIGGIIHRDLKPN 592
RRRNFVFPMTAVKKKSTLIQOMBYCENRTLYDLHSENLNQDEYMLFRQILEALSYIHSOGIIHRDLKPN 841

FEDARNDKIGDPLAKFL...KLEQDDQGGFSTDVAGSGVDSTGQASTYFYTFEEDQDWPKIDERADMYSLGV 665
FIDESRNVKIGDPLAKVHRS...LIRK...SONFSSSDNLTSATAMVYVTELDGTGHYNERIDMYSLGV 913

VFFELWHFFCTAMERHIVLTNL...KGEELKWNNEPEQAS...LIRLMSPSESDRSATELLKHAF...RPS 733
IFFEMIVPESTOMERVNLIKLLSSSIEFF...FDENNKMKEKKLIRLLIDHFNKRPARTLLNSGWLEVR 984

MESELDNITRIQTSSESSVDRVSVIFDEEVLKMSHQSRSRRCADDSYIQYEINTELRDYVVBETKEVF 808
HODEMKEALRS...SNFSSPQQQW...RESLFNQSY...SLTNDILFNSVPTSPFANILRSQMTSEVVVKF 1051

RHCACAHLEVIENRLSDCPDSRKTIV...KLTNGGDMLECYHLRLFFVHVLISVQKSSFKRYEISHVYBRAIG 882
RHHGGIENNA...PRFPKADITGTONVYELDKGGTTLQCYLTYEMARLISNPSLISKYRMOHVYRPP...DH 1124

S...PNNPCLADFDIIGGTL...LTAELVLMVIVIT...HIFHGSCDIHLNHGDLIAWWSWAGKAEHR 948
SRSSLEERKFG...DFDIISKSSSESFGFYDAESLKTIDEITVFPFPEKTNTFFILNHADYLESVFNFTNDKACR 1199

RKVAEISMMGSLRQSSSEKRWVFIHQQLQBLKPEAVVNLQTVASFCGDAQALPLRGAARARDFPR 1023
PLVSRM...SQVFAR...SFEVR...NELKACLNSSSTANDELDFDL...DFEAKKKRLY...KEMISSEHL 1263

...ALDESNLTYLVWRNTEEHVHIDVLMPTTESYHN...FFQVELTKENSSSTNDGVLLAVGGRYDMLVQ 1092
KIEDSLSHSKVLSYLKPLEARNVVISPLSNYSAYYGGIIFHAYV...DDSSRN...LIAAGGRYDMLV 1331

EVCDEHK...MNLPGAVGVSLAETIF.....QH...PMDLRP...NEV...STSVLVCRRGGGGLLV 1147
LV

FFARPSCKSSNTRKAVGFNLAMETIFGIAQNYFKLASGNRKRRNFT...DTAVDWKPSRCVLSISFSSNLT 1406

QRMELVAELWEKSIKAEFVPTPDPSLTEQYEVANEHEIKCLVIIISGVAQNQIERVKVRHLEKKEKV...VGE 1221
PRMELVAELWENKAEFVPTPDPSLTEQYEVANEHGKCLVIIITDFSLTGS...VVRHLEKKEKN...VEKKN 1479
IGVTEINI...LAKONIKAD...RDCSS...VVTGQQDGLDW...IKQAYPLNHNK...RYEFLKKEKSTNVDIEL

LVKFLLDAMAVOFNRNPSVMS - 1241
LVKFLSDAMATOFNRNPSVWI
DDEFF...FLYQQTGNK...INDSLTLGDKADEFKRWDENSSAGSSQEGDIDDVVAGSTNNQKVIYVPMNATRSKKA 1554
NKREKVVYEDAARNSSNMLHNLNAPILRDETLEIISITSLAQKEEWLRKVFGSGNNSTPRSFATSIYNNLSK 1629
EAHKGNNRWAYLYCHKTGKSSVIDLQRTVDA - 1659

B

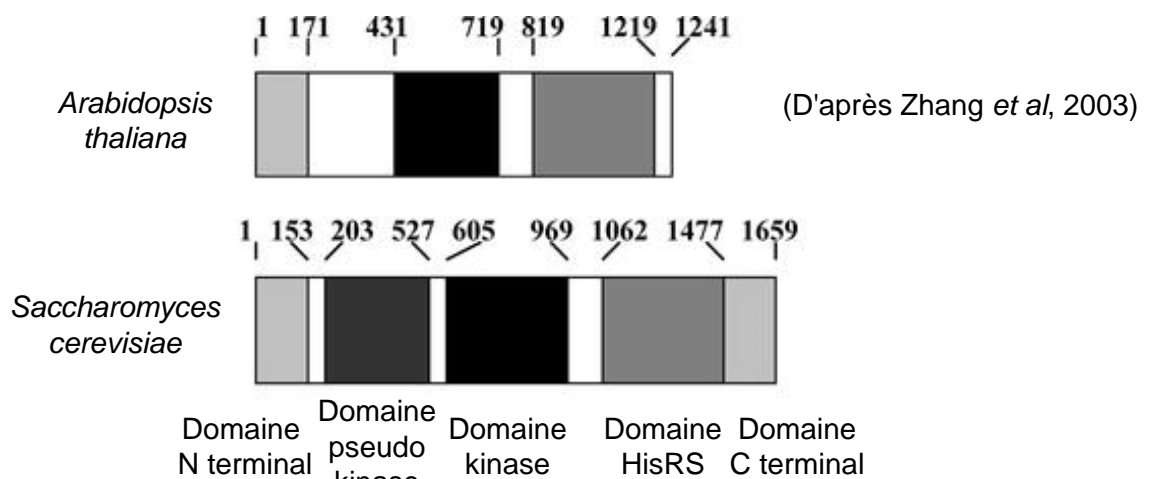


Figure 37: La protéine GCN2 chez *Arabidopsis thaliana*.

A: Comparaison de séquences entre la protéine GCN2 de levure et d'*Arabidopsis*.

B: Représentation schématique des domaines des protéines GCN2 de levure et d'*Arabidopsis*.

III.2. La kinase GCN2 chez *Arabidopsis thaliana*.

A ce jour, la seule kinase d'eIF2 α caractérisée dans le monde végétal est l'homologue de GCN2 d'*A. thaliana* : AtGCN2 (Zhang *et al.* 2003). Cette protéine possède un domaine kinase ainsi qu'un domaine HisRS de liaison potentiel à l'ARN double brin (Figure 37). Des transcrits du gène codant pour GCN2 ont été mis en évidence dans tous les organes de la plante suggérant le caractère ubiquitaire de la protéine. Enfin, la protéine AtGCN2 est capable d'éviter la mort d'une levure *gcn2* mutante en condition de carence en acides aminés.

III.3. Existence d'une activité PKR chez les plantes.

Une protéine possédant une fonction « de type PKR » a été identifiée dans des extraits d'avoines en utilisant des anticorps dirigés contre la protéine PKR humaine (Langland *et al.* 1995). La protéine de cet extrait semble être activée par de l'ARN double brin et est capable de phosphoryler *in vitro* eIF2 α (Langland *et al.* 1996). Enfin, cette même étude montre que l'ajout d'ARN double brin conduit à l'inhibition de la traduction au sein d'un extrait de germe de blé suggérant qu'une protéine de type PKR existe dans le monde végétal.

Chez les mammifères, l'activité de la protéine kinase PKR est modulée par un facteur cellulaire appelé P58^{IPK} (Gale *et al.* 1996; Tan *et al.* 1998). P58^{IPK} interagit directement avec la PKR et inhibe son activité kinase en empêchant sa dimérisation. Un homologue de P58^{IPK} a été identifié chez *Arabidopsis* et le tabac (Bilgin *et al.* 2003). La perte de cette protéine rend la plante plus sensible aux infections virales lesquelles sont associées à la phosphorylation d'eIF2 α *in vivo* chez la plante suggérant que l'infection virale chez la plante conduit bien à l'activation de la voie eIF2 α (Bilgin *et al.* 2003).

Cependant, la recherche de gènes codant pour un homologue de la PKR de mammifère au sein des génomes d'*Arabidopsis*, du riz et de la tomate n'a pas permis d'identifier une telle protéine. GCN2 semble donc être la seule kinase d'eIF2 α présente chez la plante. Il existe de nombreuses protéines de liaison à l'ARN double brin dans le monde végétal (Hiraguri *et al.* 2005; Curtin *et al.* 2008). Il serait donc possible que chez les plantes, deux protéines différentes, une possédant un domaine de liaison capable de reconnaître l'ARN virale et une

autre, comme GCN2, possédant un domaine kinase, agissent ensemble afin de jouer la fonction d'une PKR.

III.4. La voie TOR chez *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana possède un gène codant pour une protéine TOR essentielle au développement de la plante (Menand *et al.* 2002). AtTOR joue un rôle clef dans la régulation de la croissance cellulaire en réponse aux stress extérieurs en contrôlant le processus de traduction (Deprost *et al.* 2007; Sormani *et al.* 2007; Mahfouz *et al.* 2006). Chez la levure, l'inactivation de la phosphatase PP2A par la protéine TOR permet d'agir sur la voie de contrôle de la traduction par eIF2 α (Jacinto *et al.* 2001). L'existence de ce type de régulation reste à déterminer chez les plantes.

III.5. Contrôle des gènes intervenant dans la biosynthèse des acides aminés.

Chez la levure et chez les mammifères, eIF2 α est phosphorylé à la suite d'une carence en acides aminés. Cela conduit à la mise en place d'une réponse générale de l'expression des gènes de contrôle des voies de biosynthèse des acides aminés. Il s'agit en effet d'une réponse globale puisque la carence d'un seul acide aminé provoque la stimulation de nombreuses enzymes clefs des voies de biosynthèse de tous les acides aminés.

Certaines évidences suggèrent qu'il existe une régulation coordonnée des gènes codant pour les enzymes des voies de biosynthèse des acides aminés chez les plantes. Par exemple, chez *Arabidopsis*, les gènes codant les enzymes intervenant dans la synthèse du tryptophane sont induits à la suite d'une carence en cet acide aminé (Zhao *et al.* 1998). D'autre part, une carence en histidine conduit à l'activation de nombreux gènes intervenant dans sa biosynthèse mais aussi dans la fabrication de la lysine et des purines (Guyer *et al.* 1995). Cependant cette même étude montre une absence de réponse générale à la suite d'une carence en acides aminés branchés et aromatiques. Chez les plantes, l'existence d'une réponse générale des gènes intervenant dans la biosynthèse des acides aminés par la voie eIF2 α reste donc à être élucidée.

III.6. Les facteurs bZIP chez les plantes.

A ce jour, aucun homologue de GCN4 et ou d'ATF4 n'a été identifié dans le monde végétal. Cependant, chez les plantes, la famille de facteurs de transcription de type bZIP est constituée de nombreux gènes codant pour des protéines dont la structure ressemble à GCN4 et ATF4 (Jakoby *et al.* 2002; Vincentz *et al.* 2003; Martinez-Garcia *et al.* 1998). Ainsi les protéines bZIP de plantes possèdent une région basique de liaison à l'ADN et un domaine de dimérisation de type « leucine zipper ». Le génome d'*Arabidopsis thaliana* possède environ 75 facteurs bZIP et on en dénombre 89 chez le riz (Jakob *et al.* 2002; Deppmann *et al.* 2004; Nijhawan *et al.* 2008). Chez *Arabidopsis*, les facteurs bZIP sont classés en 3 grands groupes subdivisés en 20 familles (A à T) en fonction de leurs spécificités de dimérisation. Parmi les facteurs bZIP, la famille S est particulièrement intéressante. En effet au sein de cette famille, les facteurs bZIP1, bZIP2, bZIP11, bZIP44 et bZIP53 possèdent de nombreux uORF dans leur séquence 5' UTR (Wiese *et al.* 2004). Il est intéressant de noter que ces 5 facteurs possèdent des homologues dans plus de 30 espèces de plantes monocotylédons et dicotylédons (Correa *et al.* 2008; Wiese *et al.* 2004). Les transcrits codant pour ces protéines homologues ont d'ailleurs conservé leurs uORF au niveau de leurs 5' UTR (Wiese *et al.* 2004; Martinez-Garcia *et al.* 1998).

Ces facteurs voient leurs fonctions régulées à la suite de différents stress. En effet, la traduction des facteurs bZIP2 et bZIP11 est réprimée en présence de sucrose (Rook *et al.* 1998) (Wiese *et al.* 2005). Cet effet dépend de la présence des uORF présent au sein de leurs 5' UTR (Wiese *et al.* 2004; Wiese *et al.* 2005). Un autre exemple vient du facteur bZIP53 qui, à la suite d'un stress salin, vient activer la transcription du gène codant pour la proline dehydrogénase, enzyme qui catalyse la première étape de la dégradation de la proline (Sato *et al.* 2004; Weltmeier *et al.* 2006). De manière plus générale, les protéines bZIP de la famille S semblent intervenir dans la réponse à divers stress comme la réponse contre des pathogènes, contre le froid, la lumière, la sécheresse et certaines hormones de stress comme l'acide abscissique ou l'acide salicylique (Lee *et al.* 2002; Shimizu *et al.* 2005; Rugner *et al.* 2001; Ditzler and Bartels 2006; Despres *et al.* 2003).

Objectifs des travaux de thèse

L'équipe du professeur Jean-Marc Deragon s'intéresse aux différents aspects de la biologie des éléments SINE. Ainsi, les travaux réalisés au sein de l'équipe s'étendent de l'étude de l'histoire évolutive des SINE, notamment ceux de crucifères, à l'étude fonctionnelle des éléments SINE. Cette étude fonctionnelle des éléments SINE est principalement répartie sur deux axes : d'une part l'étude des mécanismes de rétroposition des SINE (incluant la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des éléments SINE, ainsi que la mobilisation et le fonctionnement de la machinerie de rétroposition) et d'autre part l'étude des fonctions cellulaires des transcrits SINE en tant que riborégulateur. Au cours de mon travail de thèse, je me suis particulièrement intéressé à cette fonction cellulaire des éléments SINE.

Chez les mammifères, l'infection par l'adénovirus conduit à l'activation de la transcription de certains éléments SINE Alu. Il s'agit d'un mécanisme conservé car il est observé avec d'autres famille de virus (le virus de l'herpes) et chez d'autres animaux (le ver à soie). Adénovirus code pour une protéine, E1A qui est capable d'interagir avec la protéine Rétinoblastome (RB). Cette interaction provoque l'inactivation de RB ce qui provoque probablement l'activation transcriptionnelle des éléments Alu. Ainsi, chez les mammifères, certaines protéines virales agissent négativement sur RB ce qui a pour conséquence de déréguler le cycle cellulaire, la transcription pol III de manière générale et la transcription des éléments SINE en particulier.

Chez les plantes, l'activation de la transcription des éléments SINE à la suite d'un stress comme l'infection virale reste à démontrer. Cependant, le virus FBNYV possède au sein de son génome une protéine, CLINK, qui est entre autre constituée d'un domaine de liaison à RB similaire à celui retrouvé chez E1A d'adénovirus. La première étape de notre étude a donc porté sur l'analyse de la protéine CLINK et plus particulièrement l'effet de cette protéine sur le cycle cellulaire, sur la transcription pol III en général et sur la transcription des SINE endogènes de plantes.

La seconde partie de mon travail a porté sur la fonction des éléments SINE de plantes au sein de la cellule. Chez les mammifères, l'élément SINE Alu est capable de jouer un rôle dans la physiologie de la cellule en réponse à certains stress. En effet, la transcription de ces

éléments est activée à la suite d'une infection par certaines familles de virus. Les transcrits ainsi produits sont alors capables d'interagir avec la protéine PKR. Ainsi, les éléments SINE sont capables d'intervenir dans des processus clefs de la cellule comme le mécanisme de régulation de la traduction.

La seule kinase d'eIF2 α identifiée chez les plantes est la protéine GCN2. Chez les mammifères et chez la levure, l'activité kinase de GCN2 est activée en présence d'ARNt libres lesquels s'associent avec le domaine de liaison à l'ARN double brin que possède la protéine. Or, nous avons vu que chez les plantes, le SINE SB1 est capable de lier certaines protéines à domaine de liaisons à l'ARN double brin (comme la protéine HYL1) afin de moduler leurs fonctions dans la cellule. D'autre part, la plupart des éléments SINE possèdent une partie 5' dérivée d'un ARN de transfert, une famille d'ARN dont la structure secondaire en trèfle est parfaitement connue. Les éléments SINE possèdent d'ailleurs une structure tridimensionnelle conservée. Il semble donc envisageable que dans le monde végétal, l'activité de la protéine kinase GCN2 soit contrôlée par un ARN SINE.

Mes travaux ont débuté par la caractérisation de la protéine GCN2 chez *Arabidopsis*. Pour cela, j'ai d'abord mis en évidence la fonction de la protéine GCN2 au sein de la cellule végétale. J'ai ensuite déterminé les mécanismes de régulation de la protéine en mettant en évidence certains inducteurs spécifiques aux plantes. J'ai aussi montré l'importance de la protéine pour la plante et découvert des fonctions potentielles de la protéine dans des voies de stress typiques des végétaux. Enfin, j'ai regardé l'impact des SINE de plantes sur l'activité de GCN2.

Résultats

I. Impact du stress viral sur la fonction RB chez *Arabidopsis thaliana*.

I.1. Article 1 : The nanovirus-encoded CLINK protein affects plant cell cycle regulation through interaction with the retinoblastoma-related protein.

La première partie de notre étude a porté sur l'analyse de l'impact de la protéine CLINK du Faba Bean Necrotic Yellow virus (FBNYV) sur le cycle cellulaire et sur la transcription pol I et pol III. En effet, cette protéine étant capable d'interagir avec la protéine RB, nous avons émis l'hypothèse que son expression au cours d'une infection virale pourrait déréguler la transcription des SINE endogènes de plantes. Néanmoins, avant de tester directement cette hypothèse, il était important de vérifier que l'expression de CLINK avait un effet perturbateur significatif sur la fonction RB. Ceci a pu être testé en étudiant les perturbations provoquées sur le cycle cellulaire par la protéine CLINK. L'impact de CLINK sur la fonction de régulateur du cycle cellulaire de RB a donc été utilisé comme contrôle positif *in vivo*.

L'expression constitutive de CLINK étant létale pour la plante, nous avons choisi d'exprimer cette protéine de manière conditionnelle. Pour cela, nous avons utilisé un promoteur inductible par une hormone, la dexaméthasone, ce qui nous a permis d'exprimer rapidement et de manière importante la protéine CLINK dans des tissus matures comme c'est le cas au cours d'une infection par un virus. Ainsi, nous avons établi des lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* exprimant la protéine CLINK ou la forme mutée dans le domaine d'interaction avec RB. Parallèlement, nous avons infecté des plantes avec le virus FBNYV pour voir l'effet global de l'infection sur le cycle cellulaire.

Le but de cette première étape de notre analyse a été de voir si, chez la plante, le blocage de la voie RB entraîne une dérégulation du cycle cellulaire. Pour cela, l'étude de plantes transgéniques pour la protéine CLINK a permis de voir que la protéine virale induit l'expression de gènes spécifiques des phases G1-S (contrôlés *via* des interactions E2F-RB), mais aussi de gènes spécifiques des phases G2-M dans des cellules matures et différenciées. Des études de cytogénétiques nous ont permis de confirmer que les cellules exprimant CLINK étaient capables de se diviser à nouveau. Parallèlement, nous avons aussi mis en évidence une augmentation du niveau de ploïdie des cellules exprimant la protéine CLINK et des plantes infectées par le FBNYV.

Notre étude *in vivo* a clairement établi que la protéine CLINK est un véritable modulateur du cycle cellulaire. Sa liaison avec RB conduit à inhiber la fonction de contrôle du cycle cellulaire de RB dans la plante ce qui présente un avantage certain dans la propagation de l'infection virale.

Ce travail a donné lieu à la publication d'un article inséré ci-après.

The Nanovirus-Encoded Clink Protein Affects Plant Cell Cycle Regulation through Interaction with the Retinoblastoma-Related Protein[†]

Sébastien Lageix,¹ Olivier Catrice,² Jean-Marc Deragon,^{1,3} Bruno Gronenborn,² Thierry Péllissier,^{1,‡,*} and Bertha Cecilia Ramírez^{2,‡,*}

CNRS UMR 6547 BIOMOVE, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex,¹ Institut des Sciences du Végétal, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette,² and I.G.D.P., UMR 5096, Université de Perpignan, 66860 Perpignan Cedex,³ France

Received 26 September 2006/Accepted 24 January 2007

Nanoviruses, multicomponent single-stranded DNA plant viruses, encode a unique cell cycle link protein, Clink, that interacts with retinoblastoma-related proteins (RBR). We have established transgenic *Arabidopsis thaliana* lines that conditionally express Clink or a Clink variant deficient in RBR binding. By controlled induction of Clink expression, we demonstrated the capacity of the Clink protein to alter RBR function in vivo. We showed that transcription of both S-phase-specific and G₂/M-phase-specific genes was up-regulated depending on the RBR-binding proficiency of Clink. Concomitantly, ploidy levels increased in a substantial fraction of leaf cell nuclei. Also, leaf epidermis cells of transgenic plants producing Clink were smaller and more numerous, indicating additional cell divisions in this tissue. Furthermore, cytogenetic analyses following induction of Clink expression in mature leaves revealed the presence of metaphasic and anaphasic nuclei, clear evidence that Clink-mediated RBR inactivation is sufficient to induce quiescent cells to reenter cell cycle progression and, for at least a fraction of them, to pass through mitosis. Expression of Clink had no effect on genes transcribed by RNA polymerases I and III, suggesting that, in contrast to its mammalian homologue, *A. thaliana* RBR is not involved in the repression of polymerase I and polymerase III transcription. The results of these in vivo analyses firmly establish Clink as a member of the diverse class of multifunctional cell cycle modulator proteins encoded by small DNA viruses.

Due to their restricted genome size, small DNA viruses do not encode polymerases and other enzymes of the DNA synthesis machinery. Instead, they exploit host DNA replication to multiply their genomes (19). This is a general feature of mammalian tumor viruses, e.g., simian virus 40 (SV40) or the papillomaviruses, which encode multifunctional regulatory proteins that cause the host cell to enter S phase, thereby making the host's DNA synthesis machinery available for virus DNA replication. Key regulators of cell cycle progression are the members of the retinoblastoma protein (RB) family, which sequester E2F/DP transcription factors in inactive complexes, thereby preventing them from gene activation (13, 53). The RB-controlled block of cell cycle progression is released in various ways, frequently by the binding of other proteins to RB and the subsequent release of the previously sequestered transcription factors. Various cellular or viral proteins bind to RB or otherwise prevent it—by hyperphosphorylation (48) or degradation (8)—from complexing S-phase relevant transcription

factors. Among the best-studied examples are the SV40 large T antigen (T-ag), human papillomavirus E7, and adenovirus E1A protein, all of which bind to the pocket domain of RB through a sequence containing the conserved amino acid motif LxCxE (41, 16).

In mammals, RB also acts as a general repressor of transcription by RNA polymerase III (PolIII) and PolII, potentially to control cell growth (reviewed in reference 29). Repression of PolII transcription is mediated through interaction between RB and the RNA PolII transcription factor UBF (10), while the different classes of PolIII-transcribed genes appear to be down-regulated via distinct mechanisms involving the interaction of RB with different transcription factors (21, 22, 47, 54). These effects require the pocket domain of RB, and LxCxE-containing viral proteins such as E1A, T-ag, and E7 are able to relieve the repressive effects of RB on PolIII and PolII transcription (29, 54).

Plant DNA viruses include members of the families *Geminiviridae* and *Nanoviridae* (43, 52). These viruses possess small single-stranded DNA (ssDNA) genomes, as opposed to the double-stranded genomes of the mammalian tumor viruses cited above, but still show striking similarities with them in the way they induce host cells to enter S phase or trigger progress beyond the G₁/S checkpoint (20).

The multifunctional replication initiator protein Rep (or AL1) of geminiviruses has been shown to bind to the plant homologues of RB, retinoblastoma-related proteins (RBR), and release the block imposed by RBR on cell cycle progression (18, 26). The binding of geminivirus Rep proteins to RBR is not always mediated by an LxCxE motif; expression of Rep

* Corresponding author. Mailing address for Thierry Péllissier: CNRS UMR 6547 BIOMOVE, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France. Phone: (33) 4 73 40 74 06. Fax: (33) 4 73 40 77 77. E-mail: thierry.pellissier@univ-bpclermont.fr. Present address for Bertha Cecilia Ramirez: Institut Pasteur, Unité de Régulation Enzymatique des Activités Cellulaires, 25 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Phone: (33) 1 40 61 35 34. Fax: (33) 1 45 68 83 99. E-mail: cecilia@pasteur.fr.

† T.P. and B.C.R. contributed equally to this work.

‡ Supplemental material for this article may be found at <http://jbc.asm.org/>.

* Published ahead of print on 31 January 2007.

proteins from viruses of the genus *Begomovirus* which lack this sequence systematically leads to the induction of cell cycle progression and S-phase-relevant genes, such as the proliferating cell nuclear antigen gene (*PCNA*) (18, 35, 36).

Members of the second plant virus family with ssDNA genomes, the nanoviruses, encode a multitude of replication initiator proteins, but only one of them, the master Rep (M-Rep), is essential for nanovirus genome multiplication (49). In addition, all nanoviruses encode a small (20-kDa) protein named Clink (for "cell cycle link") that has been shown to bind human RB and plant RBR in vitro through its LxCxE motif (5). Furthermore, Clink is an F-box protein that also interacts with Skp1 protein, a member of the Skp1/cullin/F-box protein complex targeting proteins for ubiquitin-dependent degradation by the 26S proteasome. Clink acts as a replication enhancer during infection by a nanovirus (5). The stimulating effect of Clink on DNA replication is not nanovirus specific; geminivirus DNA replication is equally enhanced (3). Although present in the genomes of all known nanoviruses, Clink is not essential for the replication of faba bean necrotic yellows virus (FBYV) DNA or for the infectivity and symptom expression of this nanovirus (50).

The in vitro interaction of Clink with RBR and its function as a replication enhancer in vivo suggested that Clink might interact with RBR in planta and trigger cell cycle progression in a manner similar to that of geminivirus Rep proteins or, for instance, SV40 T-ag. Therefore, we studied here the influence of Clink on cell cycle regulation in vivo by using transgenic *Arabidopsis thaliana* plants carrying *clink* gene constructs, conditionally inducible by the glucocorticoid hormone dexamethasone (Dex) (2).

MATERIALS AND METHODS

Recombinant DNA plasmids and plant transformation. The binary transformation vector pTA7002, containing the complete two-component glucocorticoid-inducible system (2), was cleaved with XhoI and SpeI. The DNA sequence coding either for wild type Clink or for the mutated Clink^{2112F-B114A} (Clink^{mut}) protein (5) was introduced into the pTA7002 vector as an XhoI-SpeI fragment to create pTA7002-Clink and pTA7002-Clink^{mut}, respectively. The correctness of all constructs was verified by sequencing using an automated capillary sequencer (CEQ2000) and the DTCS sequencing kit (both from Beckman Coulter).

A. thaliana Col4 plants were transformed with the pTA7002-Clink or -Clink^{mut} construct as previously described (12). Transgenic T1 seedlings were selected after 2 to 3 weeks of growth under hygromycin selection (20 µg/ml), and several independent transgenic plant lines were produced. A preliminary screening of eight *clink* and six *clink*^{mut} independent lines was performed to confirm that the expression of the viral transgenes was dependent on the presence of Dex (see Fig. S1 in the supplemental material). E2P-controlled *PCNA* gene expression was also tested and found to be up-regulated in response to Dex treatment for the eight transgenic *clink* lines, while Dex treatment had no effect on *PCNA* expression in the six *clink*^{mut} lines (see Fig. S1 in the supplemental material). Therefore, for each construct, one representative line that segregated for a single T-DNA insertion locus according to the hygromycin resistance segregation pattern was selected and established at the homozygous state. These two transgenic *clink* and *clink*^{mut} plant lines display roughly similar transgene expression under glucocorticoid induction and were used for the whole set of experiments described.

Glucocorticoid treatments and plant growing conditions. Dex (Sigma) was dissolved in 98% ethanol at 30 mM Dex (stock solution) and stored at -20°C in a light tight vial. *clink* and *clink*^{mut} plants were grown in the greenhouse for 6 to 7 weeks. For detached-leaf inductions, fully expanded mature leaves were cut from each rosette and incubated either in a solution of distilled water including Dex at a final concentration of 30 µM in 0.1% ethanol or in 0.1% ethanol as a negative (mock) control. At 0, 2, 5, 24, 48, or 72 h after induction, the leaves were collected and used for total-RNA extraction. In addition, leaves were used for total protein extraction after 24 h of induction.

Plants were germinated in vitro on standard 0.5× Murashige and Skoog (MS) medium (M 5519; Sigma) supplemented with 1% sucrose and 0.8% Bacto agar at 21°C under growth conditions of 16 h of light and 8 h of darkness. For inductions lasting 3 to 4 weeks, 3-day-old seedlings were transferred either to fresh 0.5× MS medium, 1% sucrose plates containing 30 µM Dex or to control plates containing 0.1% ethanol and were maintained under the same growth conditions. After the respective induction period, the third and fourth rosette leaves and the first cauline leaf were harvested for flow cytometry or scanning electron microscopy (SEM) analysis. Whole plants were harvested for protein extraction and immunoblot analysis. Alternatively, fully expanded mature leaves from greenhouse plants were incubated in 0.1% ethanol in the presence or absence (mock control) of 30 µM Dex and were analyzed by flow cytometry and immunoblotting after 4 days of treatment.

Infection of plants by FBNYV. *A. thaliana* plants were either infected with FBNYV by viruliferous *Aphis craccivora* aphids or mock treated with nonviruliferous aphids reared as described elsewhere (51). Two-week-old *A. thaliana* plants were exposed for an inoculation access period of 3 to 5 days, and aphids were killed with 0.2% Dedeap (Bayer). Healthy and infected plants as well as nonviruliferous and viruliferous aphids were maintained at 25°C and 50% humidity with 16 h of light in cages inside growth chambers in a restricted-access S3 confinement facility.

Cytogenetics. Plant leaf material was obtained as described for detached-leaf inductions (see above). Following fixation of the leaves in ethanol-acetic acid (3:1), nuclei were spread on a slide according to reference 40. Nuclei were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Flow cytometry. One to two square centimeters of fresh leaves was finely chopped in 600 µl of Galfraith buffer (17) supplemented with 0.1% Triton X-100 and 1% polyvinylpyrrolidone 10,000 with a sharp razor blade. The extract was filtered on 48-µm mesh, treated with 20 µg/ml of RNase A (Roche) for 10 min on ice, and stained with 20 µg/ml propidium iodide. The samples were analyzed on an EPICS Elite ESP cytometer (Coulter, Hialeah, FL). Excitation of the fluorochrome was performed by an air-cooled argon laser (Uniphase) at 488 nm and 20 mW.

Total protein extraction and immunoblot analysis. *A. thaliana* leaves or whole plants were harvested after Dex or ethanol treatment (see above). Total-protein extracts were prepared as described elsewhere (32). Leaf tissue (fresh weight, 100 mg) was ground to a fine powder using an MM301 mixer mill (Retsch) and resuspended at a 1:2 (wt/vol) ratio in 2× Laemmli buffer. The extracts were centrifuged at 15,000 × g for 15 min at 4°C, and 1/20 (10 µl) of the total proteins was fractionated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-12% polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by immunoblotting using polyclonal anti-Clink antibodies (1:500 dilution) as primary antibodies as described previously (4). Antigen was detected using an ECL detection kit (Amersham).

SEM. The leaf epidermal surface was visualized by SEM with a Hitachi S-3000N microscope under the environmental secondary electron detector mode. Samples were slowly frozen at -18°C under a partial vacuum (90 Pa) on the Peltier stage prior to observation. The adaxial lamina surfaces of the third and fourth expanded leaves of 4-week-old plants grown in the presence of Dex or ethanol were visualized. Cell areas were measured using ImageJ 1.28u software.

Total-RNA isolation, Northern blot analysis, quantification, and cell cycle gene-specific probes. Total RNA was extracted as described elsewhere (31). For Northern blot analysis, RNA samples were denatured and separated on 1% agarose-formaldehyde gels (39). The RNAs were transferred to Hybond-N⁺ membranes (Amersham-Pharmacia Biotech) by capillary blotting and fixed by UV cross-linking. Prehybridizations and hybridizations were carried out in 50% formamide-5× SSC (1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate)-1% SDS-1× Denhardt solution-100 µg/ml of sheared, denatured herring sperm DNA-10% (wt/vol) dextran sulfate at 42°C. Membranes were washed with 1× SSC-1% SDS for 15 min at 42°C and then for 15 min at 65°C, followed by two washes with 0.1× SSC-1% SDS for 15 min at 65°C. Signals were visualized by autoradiography or by using a phosphorimager (Molecular Imager FX; Bio Rad) for quantification.

For the detection of cell cycle-regulated gene transcripts, probes corresponding to parts of the *PCNA* 2 (At2g29570), *CDC6a* (At2g29680), *CDKB2;1* (At1g76540), *CycB1;1* (At4g37490), and *CycB1;4* (At2g26760) cDNAs were PCR amplified (primers available on request).

RESULTS

Production of stably transformed *A. thaliana* plants with a glucocorticoid-inducible *clink* gene. In vitro and yeast two-hybrid assays both suggested that Clink is able to interact with

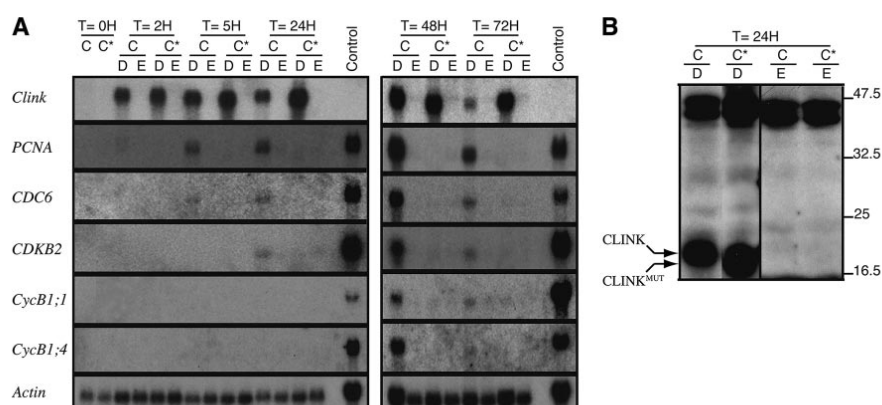


FIG. 1. Expression of viral sequences in transgenic plants, showing the impact of Clink on cell cycle-regulated gene expression. Following Dex (D) or ethanol (E) treatment of detached, fully expanded leaves, total RNAs (panel A) or proteins (panel B) were extracted and analyzed. (A) Six micrograms of total RNAs extracted from the expanded rosette leaves was used for Northern blot analysis. The time (T) of the treatment and the identity of the transgenic plant line (C, Clink; C*, Clink^{mut}) are given above the panels. The two membranes were hybridized successively with probes specific for the classes of genes given on the left (see Materials and Methods). The transcript level of *actin* was used as a control for quantification. Six micrograms of total RNA extracted from cells from an actively growing *A. thaliana* T87 suspension culture (6) was also loaded and served as a positive control for hybridization with the cell cycle-specific probes. (B) Typical immunoblot result obtained with the anti-Clink antibodies. Molecular masses of protein markers (in kilodaltons) are given on the right. As previously reported (5), the Clink^{mut} protein migrates slightly faster than the Clink protein. Equivalent amounts of proteins were loaded in each lane, as confirmed by the similar intensities of the ≈ 45 -kDa bands resulting from cross-reactions to endogenous proteins.

RB and potentially modulate the host cell cycle (5). Because we failed to establish *Arabidopsis* lines containing a *clink* transgene under the control of the strong, constitutive cauliflower mosaic virus 35S promoter, we took advantage of the tightly regulated glucocorticoid-inducible system (2). With this system, we established transgenic *A. thaliana* lines with conditional expression of Clink or of a mutated version of Clink (Clink^{mut}). The Clink^{mut} protein differs from wild-type Clink by 2 amino acids that convert the LxCxE motif to LxRxA and render it incompetent for binding to the A/B pocket domain of RBR (5). Based on a preliminary screening, representative homozygous lines expressing Clink or Clink^{mut} were selected for further studies (see Materials and Methods; also Fig. S1 in the supplemental material). Following Dex treatment for 2 to 72 h, efficient expression of the respective *clink* transgenes was obtained, leading to accumulation of comparable levels of *clink*-specific transcripts (Fig. 1A). Transcript levels were correlated with the accumulation of Clink or Clink^{mut} protein in leaf tissue as revealed by Western blot analysis using Clink-specific antibodies (Fig. 1B; see also Fig. 3D).

Clink-specific induction of cell cycle-regulated genes. To assess the cellular impact of Clink, we studied the expression of two well-known E2F-regulated genes, encoding PCNA and the chromosomal DNA replication origin protein (CDC6), in relation to Clink induction. Expression of Clink, but not Clink^{mut}, in detached, expanded 6- to 7-week-old rosette leaves was clearly associated with the transcriptional activation of both genes (Fig. 1A). *PCNA*- and *CDC6*-specific transcripts were already detectable 5 h after the beginning of Dex treatment, and a longer induction time with Clink correlated consistently with *PCNA* and *CDC6* gene expression. No impact on *PCNA*

or *CDC6* expression was observed for Dex-treated Clink^{mut} plants or ethanol-treated Clink or Clink^{mut} plants. To analyze whether Clink expression could impact the transcription of cell cycle genes other than E2F-regulated S-phase genes, the same Northern blots were hybridized with probes specific for B2-type cyclin-dependent kinases (CDKB2) and the B1-type cyclins CycB1;1 and CycB1;4. In plants, CDKB2 proteins are thought to control entry and progression through the M phase, and this class of genes (*CDKB2;1* and *CDKB2;2*) is expressed only during the G₂ and M phases (24, 27, 34). Similarly, accumulation of transcripts of plant mitotic cyclins of the B1 class is limited to the G₂ and M phases of dividing tissues (23, 37). For all three G₂/M markers, specific up-regulation was detected only when wild-type Clink was expressed (Fig. 1A). In contrast to that of *PCNA* and *CDC6*, transcriptional expression of the *CDKB2*, *CycB1;1* and *CycB1;4* genes became clearly detectable at 48 h after Clink induction (Fig. 1A). When whole plants were treated with Dex, analysis of mature leaves showed results similar to those reported in Fig. 1 (data not shown). Therefore, for short-term induction experiments, we decided to work on detached mature leaves.

To further investigate the impact of Clink on the cell cycle, nuclei were isolated from detached, expanded rosette leaves of 6- to 7-week-old Clink and Clink^{mut} transgenic plants that had been treated for 4 days with Dex or ethanol, spread, and stained with DAPI. Ethanol-treated tissues and Dex-treated Clink^{mut} plant tissues displayed similar distributions of only two types of nuclei (Fig. 2A and B), a situation typical of mature *A. thaliana* leaves (41). About 95% of these nuclei showed a mostly oval shape with irregular contours and exhibited about 10 intensely DAPI stained regions termed chromo-

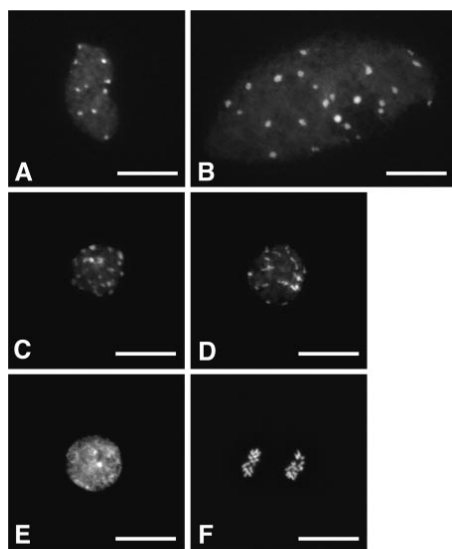


FIG. 2. Representative DAPI-stained nuclei isolated after 4 days of Dex treatment on detached, expanded 6- to 7-week-old rosette leaves from Clink-transgenic plants. The relative proportions of these different types of nuclei in Clink-expressing tissues were as follows: 33% for oval nuclei with irregular contours and ~10 CCs (A), 10% for larger nuclei with more CCs (B), 19% for smaller, rounded nuclei with >10 CCs (C and D), 1% for nuclei with highly condensed euchromatin (E), and 1% for dividing (e.g. anaphasic) nuclei (F). For Dex-treated Clink^{mut} plant leaves and ethanol-treated Clink or Clink^{mut} plant leaves, only nuclei of the types shown in panels A and B were observed, in proportions of about 95% and 5%, respectively. In each case, the relative proportions are based on the observation of 800 to 1,100 nuclei. Bars, 15 μm .

centers (CCs), which reflect the classical organization of the centromeric and nucleolus organizer heterochromatic regions (Fig. 2A). The other 5% of nuclei (Fig. 2B) appeared larger, with a higher number of CCs, a characteristic associated with a high (usually 16C to 32C) ploidy level (41). In Clink-expressing tissues, these two types of nuclei were also observed, but the proportion of the major fraction was drastically reduced, from 95% to about 33%, while the proportion of the minor fraction was increased from 5% to 10%, and new nucleus configurations became visible. Among these, a large fraction of nuclei clearly displayed some of the morphological changes associated with young, dividing cells, such as nuclear rounding and smaller nuclei (Fig. 2C, D, E, and F). For 19% of the nuclei, this phenotype also correlated with the presence of more than 10 CCs, suggesting increased levels of ploidy (Fig. 2C and D). Seven percent of the nuclei displayed an overall intense DAPI staining indicative of highly condensed euchromatin (Fig. 2E). Moreover, 1% of the nuclei were unambiguously identified as metaphasic (not shown) or anaphasic (Fig. 2F), thus providing direct evidence of mitotic activity in the Clink-expressing leaf tissue.

Phenotypic effects of Clink expression in *A. thaliana* plants. Three-day-old *A. thaliana* seedlings germinated in the absence

of Dex were transferred to new plates containing 30 μM Dex or control plates containing 0.1% ethanol and kept at 21°C with a photoperiod of 16 h of light. Under these conditions, no visible differences in the growth or morphology of leaves or roots between *A. thaliana* plants expressing Clink or Clink^{mut} and wild-type Col4 plants were observed (data not shown). The accumulation of Clink or Clink^{mut} protein in leaves was confirmed by Western blot analysis using Clink-specific antibodies (Fig. 3D). The adaxial lamina surfaces of the third and fourth expanded rosette leaves of 4-week-old plants grown in the presence of Dex or ethanol were analyzed by SEM. The wild-type *A. thaliana* leaf epidermis contains three cell types: pavement cells in a jigsaw puzzle-like pattern, stomatal cells, and trichomes. Rosette leaves of Clink-expressing plants showed clusters of small pavement cells surrounded by almost normal puzzle-shaped cells (Fig. 3A). Ethanol-treated plants (data not shown) or Dex-treated nontransgenic Col4 and Clink^{mut} plants (Fig. 3A) showed epidermal pavement cells of a normal puzzle shape and size. Comparison of nontransgenic Col4 plants and Clink-expressing plants revealed a decrease in cell size in the Clink-expressing plants (Fig. 3A and B). Cell size was quantified using SEM images of the third rosette leaves of each genotype. The results showed a significant ($P < 0.05$ by Student's *t* test) decrease in the mean cell surface area (~65%) for Clink-expressing plants (1,633 μm^2 for 210 cells measured) compared to wild-type Col4 plants (4,612 μm^2 for 180 cells measured). No significant change ($P < 0.1$) in the mean cell surface area was observed for Clink^{mut}-expressing plants (4,769 μm^2 for 210 cells measured) compared to nontransgenic Col4 plants (4,612 μm^2 for 180 cells measured). The reduction in the size of pavement cells for Clink-expressing plants was accompanied by a 4.5-fold increase in the number of pavement cells (Fig. 3C), while the numbers of pavement cells in leaves of Clink^{mut}-expressing plants and nontransgenic control plants were similar. In addition, the number of stomatal cells was 2.5-fold higher in Clink-expressing plants than in Clink^{mut}-expressing and nontransgenic control plants (Fig. 3A). These results suggest that the arrest of cell division of epidermal leaf cells in Clink-expressing plants was less synchronous than that in nontransgenic or Clink^{mut} expressing plants.

Effect of Clink expression on ploidy levels. To analyze the impact of Clink expression on endoreduplication cycles, the ploidy levels of leaves were measured by flow cytometry. The third and fourth expanded rosette leaves from 4-week-old plants of the three genotypes, grown on plates and subjected to the same induction treatment as that for plants analyzed by SEM, were used (Fig. 4A and B). Six replicates were analyzed in three independent experiments. The ploidy level of ethanol-treated plants (data not shown) and those of Dex-treated nontransgenic Col4 and Clink^{mut}-expressing plants did not show significant differences. For Clink-expressing plants, however, the fractions of 2C ($P < 0.001$ by Student's *t* test) and 4C ($P < 0.01$) ploidy level nuclei were lower, and the fractions of 16C ($P < 0.001$) and 32C ($P < 0.01$) nuclei were drastically higher, than those for nontransgenic Col4 plants. Similar results were obtained using detached leaves of 6-week-old greenhouse-grown plants when the leaves were induced for 4 days in liquid Dex medium (Fig. 4C). Collectively, these results indicate that leaf cells in Clink-expressing plants had undergone more endoreduplication cycles than those in nontransgenic Col4 and

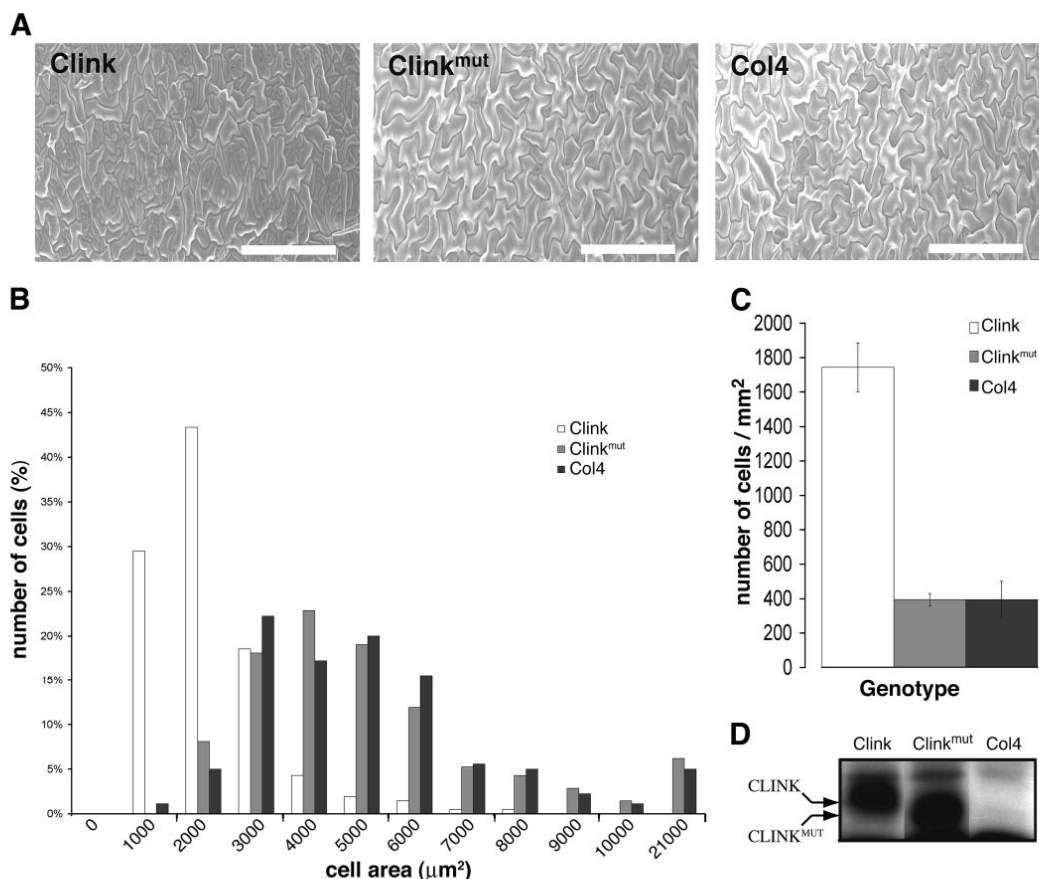


FIG. 3. Effect of Clink expression on cell size. (A) SEM of the leaf adaxial epidermis of Clink-expressing, Clink^{mut}-expressing, and nontransgenic Col4 plants. Bars, 200 μm. (B) Cell area distribution of Clink-expressing (open bars), Clink^{mut}-expressing (shaded bars), and nontransgenic (solid bars) Col4 plants. (C) Number of cells per square millimeter of leaf epidermis of Clink-expressing (open bar), Clink^{mut}-expressing (shaded bar), and nontransgenic (solid bar) Col4 plants. (D) Immunoblot analysis of total proteins from Col4 plants and from the two transgenic plant lines using Clink-specific antibodies. The identity of the plant line is given above the panel. As explained for Fig. 1B, the Clink^{mut} protein migrates faster than the Clink protein. Plants for which results are shown in panels A and D were grown and induced under the same conditions.

Clink^{mut}-expressing plants. This induction of the endoreduplication cycles clearly depended on an intact RBR-binding domain (LxCxE) of Clink; hence, interaction with RBR is required.

Ploidy levels in FBNYV-infected tissue. Infection of several ecotypes of *A. thaliana* with FBNYV by means of viruliferous *Aphis craccivora* has been established previously (J. Vega-Arreguin et al., unpublished data). Figure 5A shows the symptoms of FBNYV infection in a Col4 plant 3 weeks after inoculation by viruliferous aphids. Infected plants were stunted compared to plants that had been exposed to nonviruliferous aphids (Fig. 5A). FBNYV levels were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (kindly provided by H. J. Vetten). The virus accumulated to high levels in newly developed tissues

(data not shown). As in the case of Clink expression, infection with FBNYV resulted in a significant increase in ploidy levels in the leaf cells (Fig. 5B). Infected cauline leaves showed lower levels of 2C ($P < 0.001$) and 4C ($P < 0.05$) nuclei and higher levels of 8C ($P < 0.01$), 16C ($P < 0.05$), and 32C ($P < 0.01$) nuclei than leaves exposed to nonviruliferous aphids. The shift of ploidy to higher levels in the nuclei of FBNYV-infected cauline leaves suggests that the nuclei with elevated ploidy levels underwent virus-induced endoreduplication that paralleled viral DNA replication.

Clink expression does not influence expression of PolIII- and PolII-transcribed genes. In mammals, RB also acts as a general repressor of transcription by PolIII and PolII, potentially to control cell growth, and interacting viral proteins such

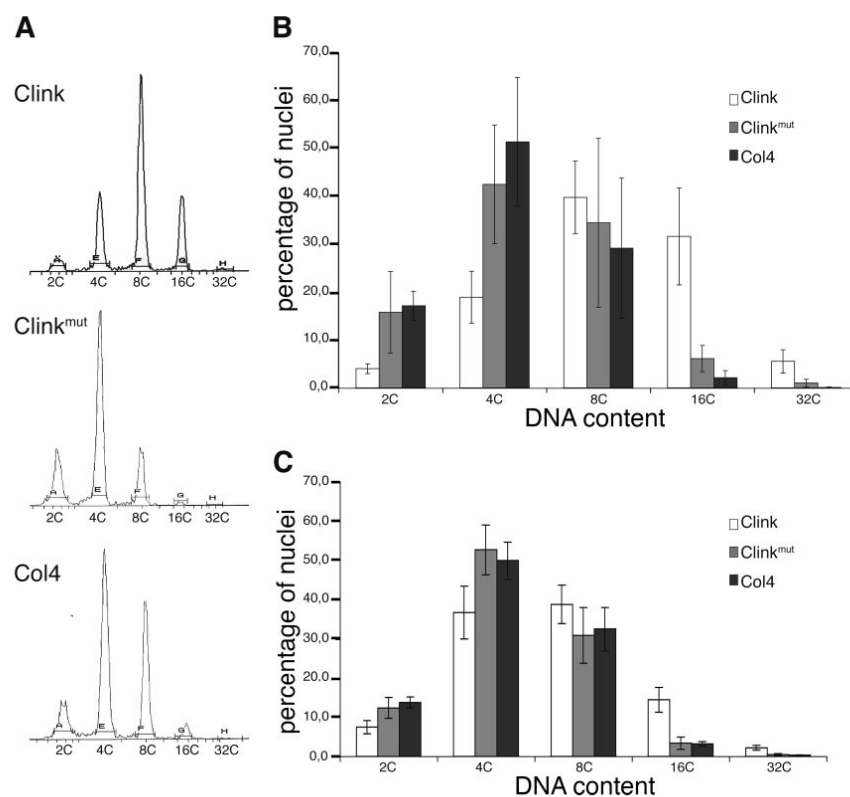


FIG. 4. Effect of Clink expression on endoreduplication in rosette and cauline leaves. (A) Flow cytometry profiles of the DNA contents of nuclei from third and fourth expanded rosette leaves of 4-week-old Clink-expressing, Clink^{mut}-expressing, and nontransgenic Col4 plants grown on plates in the presence of Dex. (B) Comparison of the DNA contents in nuclei of rosette leaves derived from Clink-expressing (open bars), Clink^{mut}-expressing (shaded bars), and nontransgenic (solid bars) Col4 plants. (C) Comparison of the DNA contents in nuclei of detached cauline leaves following 4 days of Dex treatment. For panels B and C, three independent experiments with six replicates were performed; representative results for one replicate are shown in panel A.

as T-ag, E7, and E1A are able to neutralize this repression (29). To address the question whether the same may occur in plants following the Clink-RBR interaction, we used the same RNA samples analyzed in Fig. 1A and performed polyacrylamide gel electrophoresis and several hybridizations using probes specific for (i) the PolII-transcribed 5.8S rRNA gene, (ii) the PolIII-transcribed class-1 5S rRNA gene and class-2 *tRNA^{Ala}* gene (controlled by different intragenic promoter elements), and (iii) the PolIII-transcribed class-3 7SL, U6, and U3 genes (relying solely on extragenic promoter elements) (data not shown). For the 5.8S rRNA gene and all PolIII-transcribed genes tested, induction of Clink did not correlate with a significant change in the accumulation of the respective RNA. A similar result was observed for the PolI-transcribed 18S rRNA gene (data not shown). Therefore, these results indicate that expression of Clink is not accompanied by a significant increase in gene transcription by PolIII or PolI,

suggesting a difference in the pathways of cell growth regulation by RB and RBR in mammals and plants.

DISCUSSION

Having established that the nanovirus protein Clink binds the key cell cycle regulator protein RBR and enhances the replication of FBVYV DNA (5), we studied here the influence of Clink on cell cycle regulation. For that purpose, transgenic *A. thaliana* lines were constructed in which the expression of Clink or the RBR-binding-deficient variant Clink^{mut} could be controlled by induction with the glucocorticoid hormone Dex (2).

Depending on the expression of a functional Clink protein, transcription of the E2F/DP-controlled S-phase-specific genes encoding the PCNA and CDC6 proteins was readily induced, whereas expression of Clink^{mut}, an RBR-binding-deficient

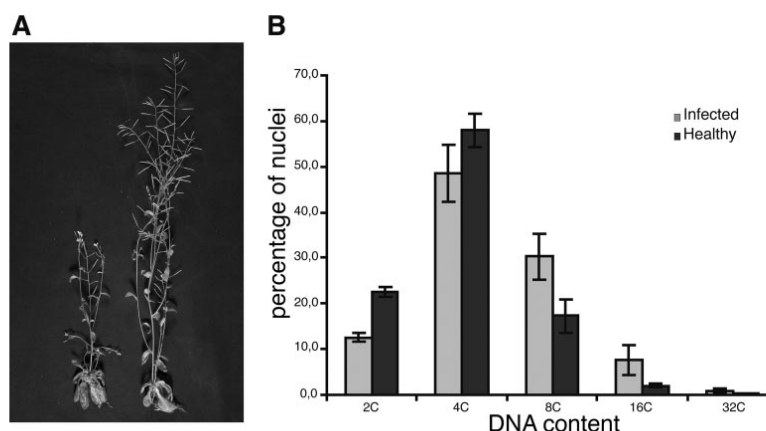


FIG. 5. FBNYV infection of *A. thaliana* plants. (A) Symptoms of an infected plant (left) compared to a healthy plant (right). (B) Ploidy levels in cauline leaves of FBNYV-infected plants (shaded bars) or healthy control plants (solid bars) 29 days postinfection.

Clink variant, did not cause any induction of *PCNA*- and *CDC6*-specific transcripts. This is consistent with the assumption that via interaction with *Arabidopsis* RBR, Clink triggers a cell cycle progression beyond the RBR-controlled checkpoint. Similar effects on the S-phase transition were reported for another plant DNA virus RBR-binding protein, the tomato golden mosaic virus Rep (or AL1) protein (15, 26, 36). Clink expression also caused increased transcription of *G₂-M*-specific genes encoding the B2-type cyclin-dependent kinases and the B1-type cyclins *CycB1;1* and *CycB1;4* (Fig. 1A). This is suggestive evidence that not only DNA synthesis (during S phase) but also, at least to some extent, mitoses and cell divisions might be triggered by the induced expression of Clink. These findings were further supported by in situ fluorescence analyses of DAPI-stained nuclei derived from Clink- and Clink^{mut}-transgenic plant leaves (Fig. 2). Following expression of Clink, but not Clink^{mut}, the fraction of leaf nuclei displaying more than 10 CCs increased from 5% to 29% (Fig. 2B, C, and D); moreover, about 1% of metaphasic or anaphasic nuclei (Fig. 2F) were clearly identified among Clink-expressing cells, a situation unexpected in mature *Arabidopsis* leaves. These results provide clear evidence of Clink-induced cell cycle reactivation in mature leaf tissues associated with enhanced endoreduplication and some mitotic activity. Recently, the geminivirus RBR-binding RepA protein was also shown to affect the *G₂-M* transition in transgenic *Arabidopsis* plants (14). Following disruption of RBR function by RepA in late-developing rosette leaves, a general increase in the ploidy levels of leaf nuclei was observed, and fully expanded pavement cells displayed the capacity to engage in a single division event. In our case, these epidermal cells are also likely to account for at least a fraction of the mitotic events observed in response to Clink induction in fully differentiated rosette leaves from 6- to 7-week-old seedlings.

In contrast to the small DNA viruses of mammals, which cause extended cell proliferation (tumors), such excessive cell proliferation has never been observed to be associated with

infection of plants by ssDNA viruses. Only limited tissue proliferation or cell enlargement is caused by some geminivirus proteins (30, 44). It was therefore of interest to assess the effect of prolonged (3- to 4-week) expression of the cell cycle “deregulator” Clink on plant tissue. Clink-expressing as well as Clink^{mut}-expressing plants that had been grown for 4 weeks in the presence of Dex showed no obvious morphological differences. A closer inspection of the adaxial epidermis by SEM, however, revealed a clearly different phenotype for Clink-expressing plants than for Clink^{mut}-expressing plants or non-transgenic Col4 plants (Fig. 3). Clink-expressing plants had a significantly increased fraction of smaller epidermal cells (extrapolated from their smaller surface area), and this size reduction was accompanied by increases in the numbers of pavement and stomatal cells (Fig. 3). Similar phenotypes have been described for *Arabidopsis* plants overexpressing E2Fa-DPa (7), AtCDT1, or AtCDC6 (9) and for *Arabidopsis* plants subject to geminivirus RepA-induced RBR inactivation (14). This is in line with the assumption that due to prolonged expression of functional Clink, the RBR-imposed block of transcriptional activators of the E2F family remained suspended, and some mitotic cycles and subsequent epidermal cell divisions occurred. Concomitantly, the ploidy levels of nuclei from the third and fourth expanded rosette leaves and cauline leaves from the same plants (4 weeks of Dex induction), assessed by flow cytometry, revealed a clear shift toward 16C and 32C DNA contents (Fig. 4A and B). The beginning of such a shift toward a higher ploidy level could already be observed after 4 days of Clink induction (Fig. 4C). The Clink-induced increase in epidermal pavement cell and stomatal cell division and the concomitantly elevated level of ploidy of total nuclei from the corresponding leaves suggest a differential effect of Clink on the nuclear cycle in epidermal cells and total tissue nuclei. These changes are the consequence of transcriptional reprogramming suggested by the up-regulation of E2F target genes. In epidermal cells, no endoreduplication occurred beyond the already existing level (not determined), because larger epider-

mal cells, expected in the case of a higher degree of ploidy (see, for instance, references 28 and 33), were not observed. At the same time, in total cells from the same leaves, a fraction of nuclei existed that had undergone more endocycles. Since Clink clearly triggers transcription of S-phase-specific genes, e.g., *PCNA* and *CDC6*, as well as the mitotic cyclin *cycB1;1*, a dichotomy in the effect of Clink on cell cycle regulation in the nuclei of cells of different tissues is easily conceivable. Such a balanced dichotomy in E2F/DP-dependent effects on the cell cycle and cell fate has also been proposed by others (7, 9, 14). Indeed, the authors concluded that the RBR/E2F pathway regulates the balance between cell proliferation, endocycle program, and differentiation. They also concluded that the importance of this pathway depends on the cell type, the tissue, and the developmental stage.

A clear shift of the nuclear ploidy to elevated levels (8, 16, and 32C) was observed in cauline leaves of FBNYV-infected *A. thaliana* plants (Fig. 5). It is tempting to speculate that the endocycling nuclei are derived either from cells that are targeted by FBNYV for its replication or from cells that contain at least some FBNYV DNA components. Nanoviruses are assumed to be restricted to the phloem (52), but the impact on the overall ploidy level detected for FBNYV-infected cauline leaves suggests that this is not the case. No data are available on the multiplication of FBNYV in epidermal cells, and whether nanoviruses invade the mesophyll is not known. Attempts to determine the tropism of FBNYV in *A. thaliana* by immunolocalization with the available polyclonal antibodies against Clink, M-Rep, and FBNYV particles were unsuccessful, due to cross-reaction of these antibodies with host plant proteins. Nanoviruses (52), including FBNYV (B. C. Ramirez, unpublished results), code for two proteins involved in cell-to-cell movement, DNA-N codes for a nuclear shuttle protein and DNA-M for a movement protein. The movement protein and nuclear shuttle protein coordinate the movement of viral DNA as viral nucleoprotein complexes from the nucleus to the cytoplasm and from the cytoplasm to the neighboring cells. It is possible that nanoviruses have the capacity to invade non-phloem tissues, since this has been observed for some bipartite geminiviruses such as the begomovirus bean dwarf mosaic virus (38). On the other hand, it is also possible that some FBNYV DNA components are not limited to the phloem, at least in *A. thaliana*. Recent studies (42) with the nanovirus milk vetch dwarf virus (MDV) indicate that the expression of the individual DNA components is differentially regulated: the promoter of MDV-M is active not only in phloem and meristematic tissues but also in mesophyll and cortex cells. It therefore appears logical to assume that nuclei with an elevated ploidy level underwent virus-induced (i.e., Clink-triggered) endoreduplication that paralleled viral DNA replication. A similar situation was previously reported for infection of *Digitaria setigera* with the mastrevirus *Digitaria* streak virus, which was accompanied by an increase in the fraction of S-phase nuclei (1).

Since the effects of Clink on the expression of cell cycle-relevant genes involving interaction with RBR proteins are in many aspects comparable to those of the cell cycle regulators of small DNA tumor viruses such as SV40 T-ag or E7 of human papillomaviruses, we were interested in seeing whether Clink might also influence the transcription by PolI and PolIII of

genes implicated in cell growth regulation (for a review, see reference 29). Northern blot analyses of the PolI-transcribed 5.8S rRNA gene and of five PolIII-transcribed genes, the 5S rRNA, *rRNA2a*, *7SL*, *U6*, and *U3* genes, revealed no significant differences in transcript accumulation upon Clink induction (data not shown). Therefore, these classes of genes involved in cell growth regulation are not affected by Clink, in agreement with the observation that no gross increase in cell size was observed in Clink-expressing tissue. Also, for the RBR-interacting cell cycle modulators of other ssDNA plant viruses, e.g., the mastrevirus RepA protein and the begomovirus Rep (AI.1) protein, no increase in cell size has been reported. The only protein known to cause an increase in cell size is the C4 protein of beet curly top virus (30). Hence, to regulate their cell growth (size), plants and animals have obviously evolved diverging molecular strategies (for reviews, see references 25, 45, and 46).

In the present study, we have shown that the nanovirus cell cycle link protein Clink significantly interferes with the plant cell cycle *in vivo*, conceivably via interaction with cell RBR. An intriguing question still remains, however: what is the biological significance of Clink as an F-box protein, its binding to SKP1, and its connection to the SCF-regulated protein turnover pathway? A "transgenic" approach comparable to that described here, employing the tightly regulated conditional expression of Clink or mutant Clink, may be useful for shedding further light on the molecular details of other Clink functions and on nanovirus biology in general.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ingo Schubert and Olivier Mathieu for assistance in the analysis of the cytogenetics data, Julien Douet for help with the cytogenetics experiments, Séverine Domenichini for assistance with SEM, and Julio Vega-Arreaga for help with the aphid colonies. We thank the "Dynamique de la compartimentation cellulaire" laboratory for their help and valuable discussions with the immunolocalization and flow cytometry studies. We thank Susanne Bolte and Marie-Noëlle Soler for expert support with microscopy. We are grateful to Danielle Clerot for her valuable help concerning the measurements of the cell surfaces. We are also grateful to Nam-Hai Chua for the generous gift of the PTA7002 vector, to Eva Kondarosi for providing the CycB1:1 probe, and to H. J. Vetter for the enzyme-linked immunosorbent assay and for antibodies to FBNYV. We thank Anne-Lise Haenni for valuable suggestions.

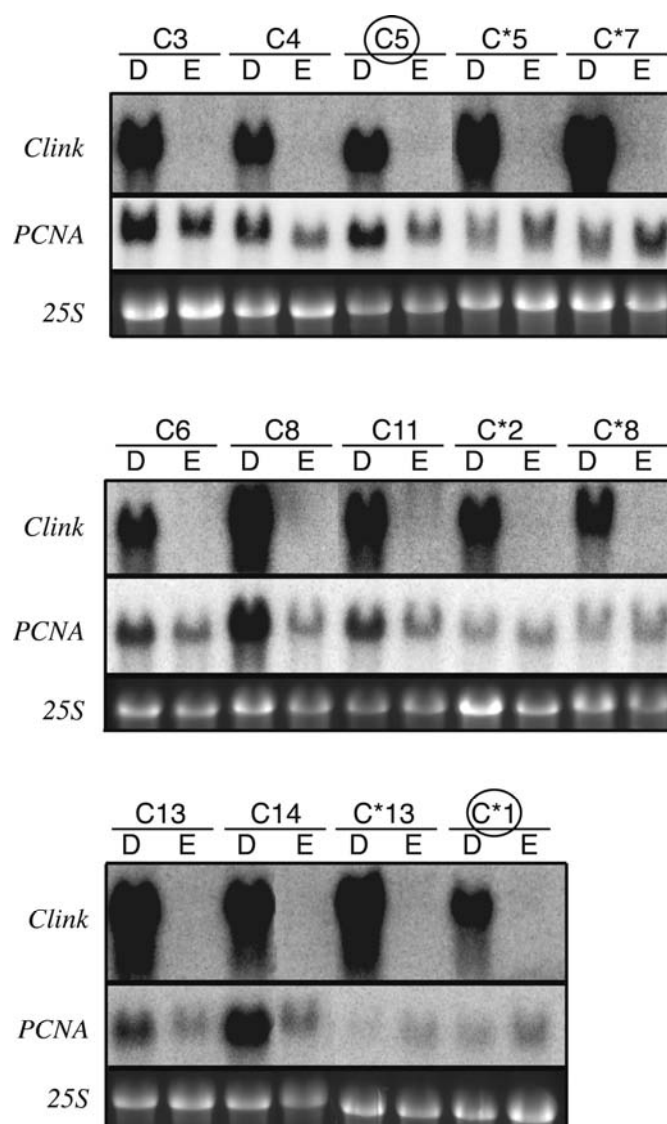
This work was partly supported by the CNRS (UMR 6547 BIOMOVE and HDR2157), by the Université Blaise Pascal, and by a grant from the European Commission as part of the RIBOREG EL FP6 project (LSHG-CT-2003503022). S. Lageix is the recipient of a French MNRT grant. The Imaging and Cell Biology facility of the IFR87 (FR-W2251) "La plante et son environnement" is supported by "Action de Soutien à la Technologie et la Recherche en Essaim," Conseil Général de l'Essonne.

REFERENCES

1. Acotto, G. P., P. M. Mullineaux, S. C. Brown, and D. Marie. 1993. *Digitaria* streak geminivirus replicative forms are abundant in S phase nuclei of infected cells. *Virology* 195:257–259.
2. Aoyama, T., and N. H. Chua. 1997. A glucocorticoid mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* 11:605–612.
3. Aronson, M. 2002. Ph.D. thesis, Institut National d'Agronomie Paris Grignon, Paris, France.
4. Aronson, M. N., A. Comptainville, D. Clerot, H. Abadie, L. Kafel, H. J. Vetter, B. Gronenborn, and T. Tsuchenko. 2002. In planta protein-protein interactions assessed using a nanovirus-based replication and expression system. *Plant J.* 31:767–775.
5. Aronson, M. N., A. D. Mewer, J. Gyorgyev, L. Kafel, H. J. Vetter, B. Gronenborn, and T. Tsuchenko. 2000. Clink, a nanovirus-encoded protein, binds both pRB and SKP1. *J. Virol.* 74:2967–2972.

6. Avelos, M., C. Curie, L. Mazzolini, C. Bardet, and B. Lescure. 1992. A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell culture. *Plant Physiol. Biochem.* 30:1-5.
7. Bordoli, V., K. Viegles, G. T. Beemster, Z. Magyar, J. A. Torres Acosta, S. Maes, E. Van Der Schueren, D. Inze, and L. De Veylder. 2004. The plant specific cyclin dependent kinase CDK11 and transcription factor E2F4 control the balance of mitotically dividing and endoreplicating cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2663-2692.
8. Boyer, S. N., D. E. Wazer, and V. Band. 1996. E7 protein of human papilloma virus 16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 56:4620-4624.
9. Castellano Mdel, M., M. B. Bonifati, E. Caro, A. Schmitz, and C. Gutierrez. 2004. DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreplication in a cell type-specific manner. *Plant Cell* 16:2363-2393.
10. Cavonius, A. H., W. M. Hempel, L. J. Taylor, V. Rogalsky, G. Todorov, and L. I. Rothblum. 1995. Activity of RNA polymerase I transcription factor TIFB blocked by Rb gene product. *Nature* 374:177-180.
11. Chellappan, S., V. B. Kraus, B. Kr  ger, K. Munger, P. M. Howley, W. C. Hsieh, and J. R. Nevins. 1992. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4549-4553.
12. Clough, S. J., and A. F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16:735-743.
13. de Jager, S. M., S. Manghani, W. Dewitte, S. Scofield, and J. A. Murray. 2005. The developmental context of cell cycle control in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16:385-396.
14. Desroches, B., E. Ramirez-Parra, Q. Xie, N. H. Chua, and C. Gutierrez. 2006. Cell type specific role of the retinoblastoma-E2F pathway during *Arabidopsis* leaf development. *Plant Physiol.* 140:67-80.
15. Egelkrout, E. M., D. Robertson, and L. Hanley-Bowdoin. 2003. Proliferating cell nuclear antigen expression is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* 15:1137-1152.
16. Felsani, A., A. M. Milco, and M. G. Paggi. 2006. Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene* 25:5277-5285.
17. Galbraith, D. W., K. R. Harkins, J. R. Maddox, N. M. Ayres, D. P. Sharma, and E. Fritschy. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220:1049-1051.
18. Gutierrez, C. 2002. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60:219-230.
19. Gutierrez, C., E. Ramirez-Parra, M. Mac Castellano, A. P. Sanz-Burgos, A. Laque, and R. Mischak. 2003. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Vet. Microbiol.* 98:111-119.
20. Hanley-Bowdoin, L., S. B. Settledge, and D. Robertson. 2004. Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *Mol. Plant Pathol.* 5:149-156.
21. Hirsch, H. A., L. Gu, and R. W. Henry. 2000. The retinoblastoma tumor suppressor protein targets distinct general transcription factors to regulate RNA polymerase II gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 20:9182-9191.
22. Hirsch, H. A., G. W. Jawdelar, K. A. Lee, L. Gu, and R. W. Henry. 2001. Distinct mechanisms for repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Mol. Cell. Biol.* 21:5989-5996.
23. Ito, M. 2000. Factors controlling cyclin D expression. *Plant Mol. Biol.* 43:677-690.
24. Joubes, J., and C. Chevalier. 2000. Endoreplication in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 43:733-745.
25. Kondroski, E., F. Roudier, and E. Gendreau. 2000. Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:488-492.
26. Kong, L. J., B. M. Orosco, J. L. Roe, S. Nagar, S. Ou, H. S. Feller, T. Burke, A. B. Miller, W. Grossman, D. Robertson, and L. Hanley-Bowdoin. 2000. A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J.* 19:3435-3445.
27. Kono, A., C. Uneda-Hara, J. Lee, M. Ito, H. Uehama, and M. Uneda. 2003. *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD11 is a novel cyclin partner of B2 type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiol.* 132:1315-1321.
28. Kudo, N., and Y. Kimura. 2002. Nuclear DNA endoreplication during petal development in cabbage: relationship between ploidy levels and cell size. *J. Exp. Bot.* 53:1017-1023.
29. Larimore, C. G., H. M. Alzabher, C. A. Cairns, A. McLees, and R. J. White. 1996. Transcription by RNA polymerases I and III: a potential link between cell growth, protein synthesis and the retinoblastoma protein. *J. Mol. Med.* 74:694-698.
30. Latham, J. R., K. Saunders, M. S. Pinner, and J. Stanley. 1997. Infection of plant cell division by beet curly top virus gene C4. *Plant J.* 11:1273-1283.
31. Legermann, J., J. Scheff, and L. Wilmshurst. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163:16-20.
32. Martinez-Garcia, J. F., E. Monte, and P. H. Quad. 1999. A simple, rapid and quantitative method for preparing *Arabidopsis* protein extracts for immunoblot analysis. *Plant J.* 20:251-257.
33. Melzer, J. B., R. Melzer, and A. W. Coleman. 1993. Relationship between endoreplication and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5:1661-1668.
34. Menzes, M., and J. A. Murray. 2002. Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell cycle gene activity. *Plant J.* 30:203-212.
35. Nagar, S., L. Hanley-Bowdoin, and D. Robertson. 2002. Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *Plant Cell* 14:2995-3007.
36. Nagar, S., T. J. Pedersen, K. M. Carrick, L. Hanley-Bowdoin, and D. Robertson. 1995. A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* 7:705-710.
37. Potuschak, T., and P. Doerner. 2003. Cell cycle controls: genome-wide analysis in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:501-506.
38. Rojas, M. R., C. Hagen, W. J. Lucas, and R. L. Gilbertson. 2005. Exploiting clinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:361-384.
39. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
40. Schubert, I., P. F. Franz, J. Fuchs, and J. H. de Jong. 2001. Chromosome painting in plants. *Methods Cell Sci.* 23:57-69.
41. Schubert, V., M. Klatte, A. Peckina, A. Meister, Z. Jasencakova, and I. Schubert. 2006. Sister chromatids are often incompletely aligned in meristematic and endoreplicative interphase nuclei of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 172:467-475.
42. Shirasawa-Seo, N., Y. Sano, S. Nakamura, T. Murakami, S. Seo, Y. Ohashi, Y. Hashimoto, and T. Matsumoto. 2005. Characteristics of the promoters derived from the single stranded DNA components of milk vetch dwarf virus in transgenic tobacco. *J. Gen. Virol.* 86:1551-1560.
43. Stanley, J., D. M. Bisaro, R. W. Bridgton, J. K. Brown, C. M. Fauquet, R. D. Harrison, E. P. Rybicki, and D. C. Stenger. 2005. *Geminiviridae*, p. 301-326. In: C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball (ed.), *Virus taxonomy*. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London, United Kingdom.
44. Stanley, J., and J. R. Latham. 1992. A symptom variant of beet curly top geminivirus produced by mutation of open reading frame C4. *Virology* 190:506-509.
45. Stocker, H., and E. Hafen. 2006. Genetic control of cell size. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16:529-535.
46. Sugimoto-Shirasawa, K., and K. Roberts. 2003. "Big it up": endoreplication and cell-size control in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:544-553.
47. Sutcliffe, J. E., T. R. Brown, S. J. Allison, P. H. Scott, and R. J. White. 2000. Retinoblastoma protein disrupts interactions required for RNA polymerase III transcription. *Mol. Cell. Biol.* 20:9192-9202.
48. Taya, Y. 1997. RB kinases and RB binding proteins: new points of view. *Trends Biochem. Sci.* 22:11-17.
49. Timchenko, T., F. de Kouchkovsky, I. Katsul, C. David, H. J. Vetter, and B. Gronenborn. 1999. A single rep protein initiates replication of multiple genome components of faba bean necrotic yellows virus, a single stranded DNA virus of plants. *J. Virol.* 73:10173-10182.
50. Timchenko, T., I. Katsul, M. Anonson, J. C. Vega-Arreaga, B. C. Ramirez, H. J. Vetter, and B. Gronenborn. 2006. Infectivity of noncoding DNAs: induction of disease by cloned genome components of faba bean necrotic yellows virus. *J. Gen. Virol.* 87:1735-1743.
51. Vega-Arreaga, J. C., T. Timchenko, B. Gronenborn, and B. C. Ramirez. 2005. A functional histidine-tagged replication initiator protein: implications for the study of single stranded DNA virus replication in plants. *J. Virol.* 79:8422-8430.
52. Vetter, H. J., P. W. G. Cho, J. L. Dale, R. Harding, J. Hu, L. Katol, M. Kojima, J. W. Randles, Y. Sano, and J. E. Thomas. 2003. *Geminiviridae*, p. 343-352. In: C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball (ed.), *Virus taxonomy*. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London, United Kingdom.
53. Weinberg, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:23-36.
54. White, R. J., D. Trouche, K. Martin, S. P. Jackson, and T. Kouzarides. 1996. Repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma protein. *Nature* 382:65-70.

SUPPLEMENTARY DATA.



SUPPLEMENTARY FIG. 1. Expression of the viral transgenes in CLINK and CLINK^{mut} transgenic lines and its impact on cell-cycle gene regulation. Eight CLINK (C) and six CLINK^{mut} (C*) independent transgenic lines were tested in a preliminary screening. 15 µg of total RNAs was extracted from aerial parts of two-week-old plantlets following a 24 h dex (D) or ethanol (E) treatment. The identity of the probes used is indicated on the left. 25S RNA served as loading control. Following dex treatment, comparable levels of CLINK and CLINK^{mut} specific-transcripts were detected for all the transgenic lines, but upregulation of the E2F-controlled *PCNA* gene expression was observed for the eight CLINK-expressing lines only. The CLINK n°5 and CLINK^{mut} n°1 lines (pointed by a circle) were selected and used as representative lines for the rest of the study.

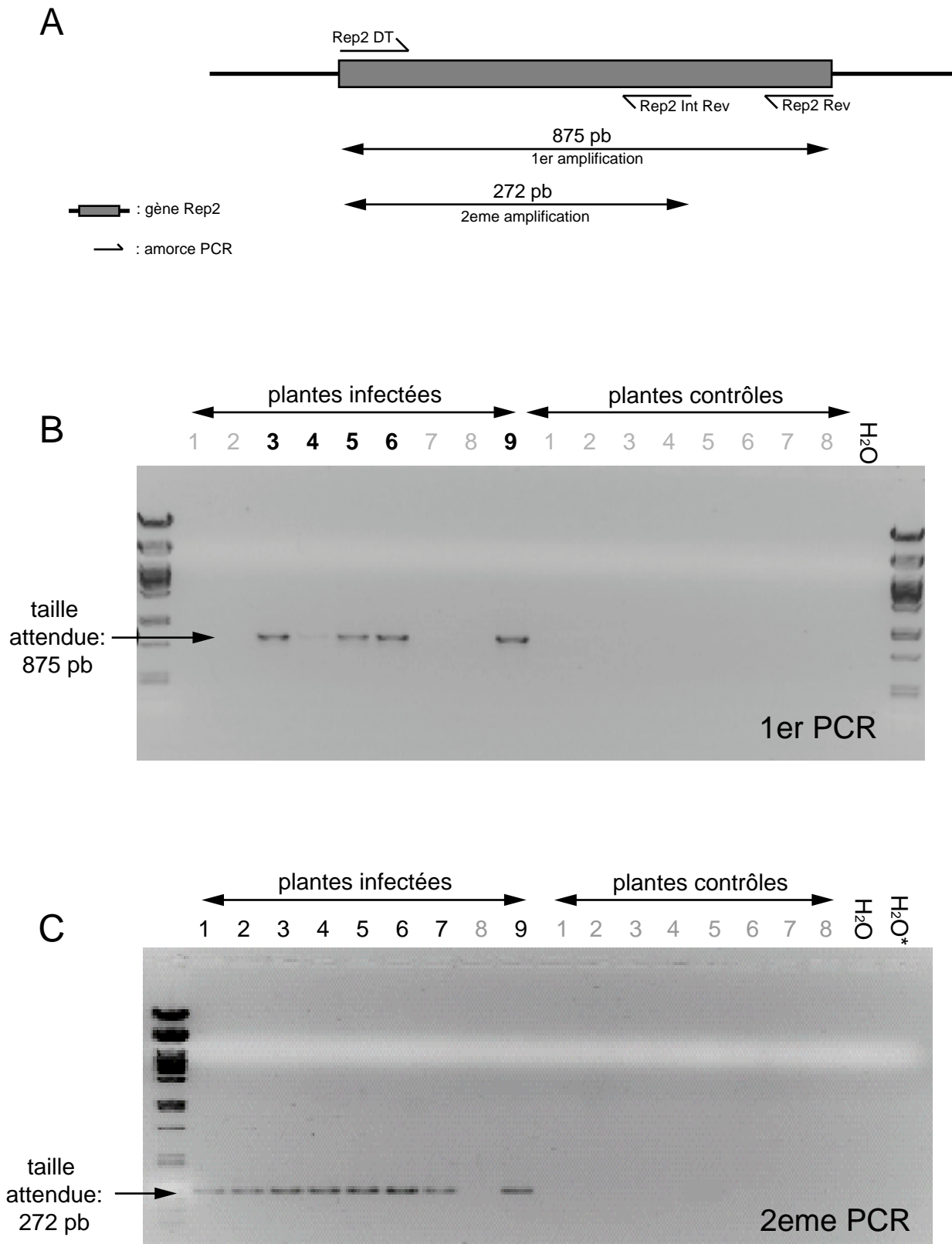


Figure 38: Crible de l'infection virale par PCR.

A: Principe du crible par PCR pour la présence de l'ADN viral Rep2.

B: Résultats de la première amplification de l'ADN viral.

C: Résultats de la seconde amplification de l'ADN viral.

Les plantes révélées positives à l'amplification sont indiquées en caractères gras.

I.2. Données supplémentaires.

L'activation transcriptionnelle des SINE en réponse à différents types de stress apparaît comme un phénomène largement répandu chez les animaux et a conduit à proposer que ces éléments puissent être de véritables "gènes de stress", une fonction potentiellement conservée chez les eucaryotes supérieurs (Cf. paragraphe VII de la synthèse bibliographique).

Pour évaluer le rôle potentiel des éléments SINE dans la réponse cellulaire au stress chez les plantes, nous avons testé l'impact d'une infection virale sur la transcription des gènes pol III, en particulier sur la transcription des éléments SINE d'*Arabidopsis thaliana*.

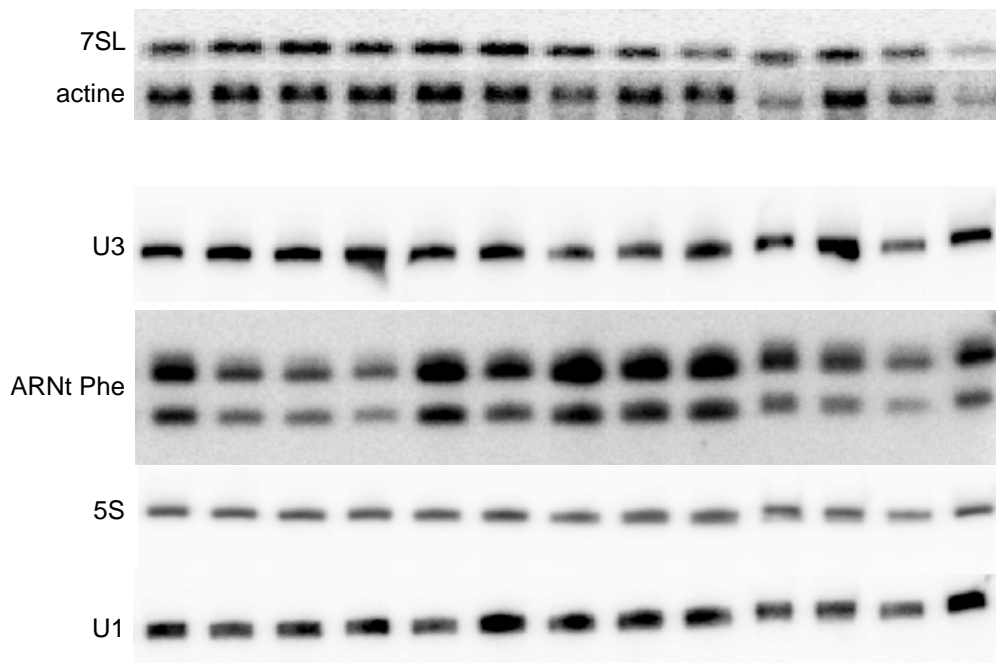
I.2.1) Impact de l'infection virale sur la transcription pol III.

a. Crible des plantes infectées par le virus FBNYV.

Pour identifier les plantes ayant développé une infection systémique après contact avec des insectes porteurs du virus, l'ADN extrait des tissus aériens de chacune des plantes congelées a été criblé par PCR pour la présence du virus en utilisant des amorces ciblant une région de la réplicase virale (Rep2) ou de la protéine CLINK. Les amorces utilisées sont décrites en annexe 5. Chaque ADN a subi une première PCR suivie d'une seconde PCR en utilisant une amorce interne à la première amplification (Figure 38). Une amplification du gène Rep est visible dès la première PCR chez 5 des 9 plantes potentiellement infectées (les plantes n°3, 4, 5, 6 et 9) (Figure 38). Une deuxième amplification montre que toutes les plantes mises en contact avec le virus (excepté la plante n°8) sont réellement infectées (Figure 38) mais suggère que le niveau d'infection puisse varier entre les différentes plantes. L'ADN de plantes contrôles mises en contact avec les insectes sains a été utilisé comme contrôle négatif. Comme attendu, aucun signal d'amplification de l'ADN viral n'a été obtenu.

Ainsi nous avons pu mettre en évidence la présence d'une infection systémique dans la majorité des plantes (8/9 soit 90% des plantes) qui peuvent donc être également utilisées pour la suite de l'analyse.

A



B

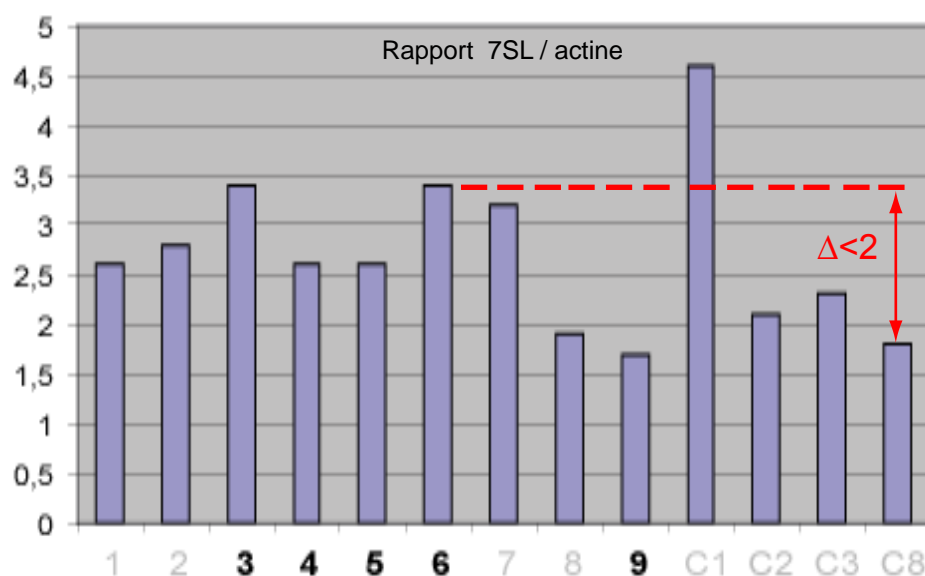


Figure 39: Quantification de l'expression des transcrit pol III à la suite de l'infection virale.

A: Hybridation avec les sondes 7SL, actine, U3, ARNt phénylalanine, 5S et U1.

B: Quantification de la quantité de transcrit 7SL chez les plantes infectées et les plantes contrôles.

Les plantes révélées positives à la première amplification PCR sont indiquées en caractères gras.

b. Quantification de l'expression de gènes pol III chez les plantes infectées.

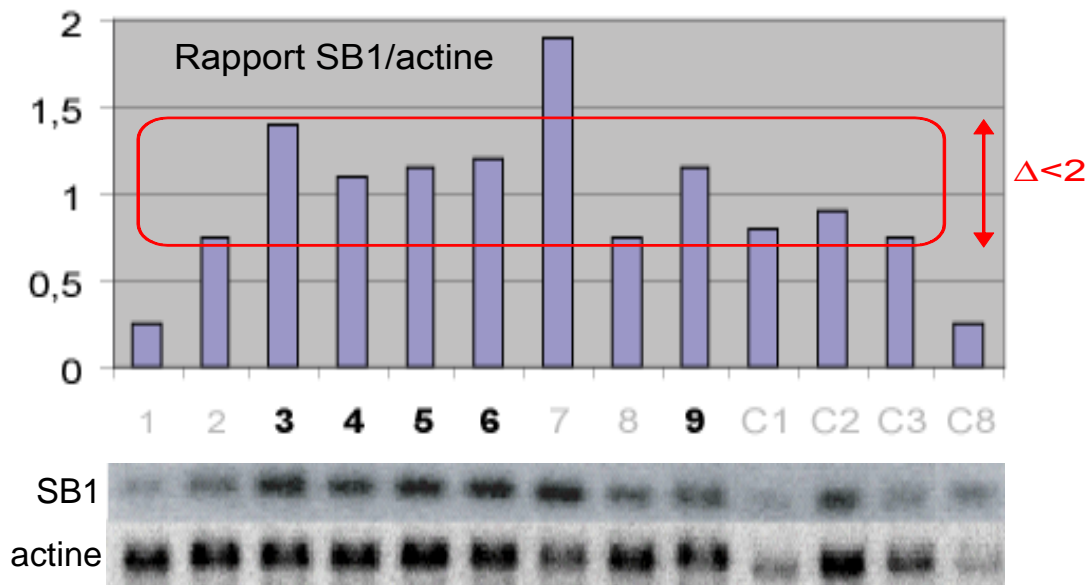
Afin de voir un éventuel impact de l'infection virale sur la transcription pol III, l'ARN extrait de chacune des plantes infectées ainsi que de plusieurs plantes contrôles a été utilisé pour tester le niveau d'accumulation de différents transcrits pol III par Northern-blot.

Le niveau d'accumulation à l'équilibre des gènes testés a été normalisé par rapport aux transcrits U1 ou actine. L'expression de ce gène transcrit par l'ARN polymérase II est attendu relativement stable entre plantes au même stade de développement, le gène actine étant d'ailleurs communément utilisé comme standard dans des expériences de quantification. De même, l'expression du gène U1 a été détectée comme étant stable notamment au niveau des tissus foliaires quel que soit leur stade de développement (Egeland *et al.* 1989).

L'ARN extrait des parties aériennes (principalement à partir de tissus foliaires des plantes) a été séparé sur un gel MOPS-agarose. L'ensemble des plantes mises en contact avec l'insecte porteur du virus ont été analysées (Figure 38, plantes infectées n°1 à 9). Cette approche doit nous permettre de tester la réponse des gènes pol III sur des plantes présentant différents niveau d'infection, les plantes positives pour la première amplification PCR pouvant être considérées comme plus infectées que les plantes positives pour la seconde amplification uniquement ; la plante 8 peut être assimilée à une plante non infectée par le virus. L'expression de différents transcrits pol III a ensuite été déterminée grâce à l'hybridation de sondes spécifiques. Les résultats obtenus avec les sondes 7SL et actine sont montrés en Figure 39. Après quantification des signaux, le niveau relatif d'accumulation du transcrit pol III 7SL par rapport au transcrit actine est représenté dans l'histogramme. Cette valeur relative varie de 1,6 à 3,4 pour les plantes infectées et de 1,8 à 4,5 pour les plantes contrôles suggérant qu'il n'existe pas ou peu de variation dans l'accumulation des transcrits pol III 7SL entre les plantes infectées et les plantes contrôles. Ainsi, le rapport entre le niveau de transcrit 7SL le plus important observé pour une plante infectée (n°6) et le plus faible observé pour une plante contrôle (C8) est de l'ordre de 1.75, un chiffre inférieur à celui de la variabilité observée entre plantes contrôles (environ 2.5). De manière similaire, aucune variation supérieure à 2 n'a été observée en utilisant le gène U1 comme standard.

D'autres transcrits pol III ont été testés dans les mêmes conditions (ARN U3, ARNt phénylalanine et ARN 5S) mais comme précédemment, ces gènes voient leur niveau de transcrits rester relativement stable suite à l'infection virale (Figure 39).

A



B

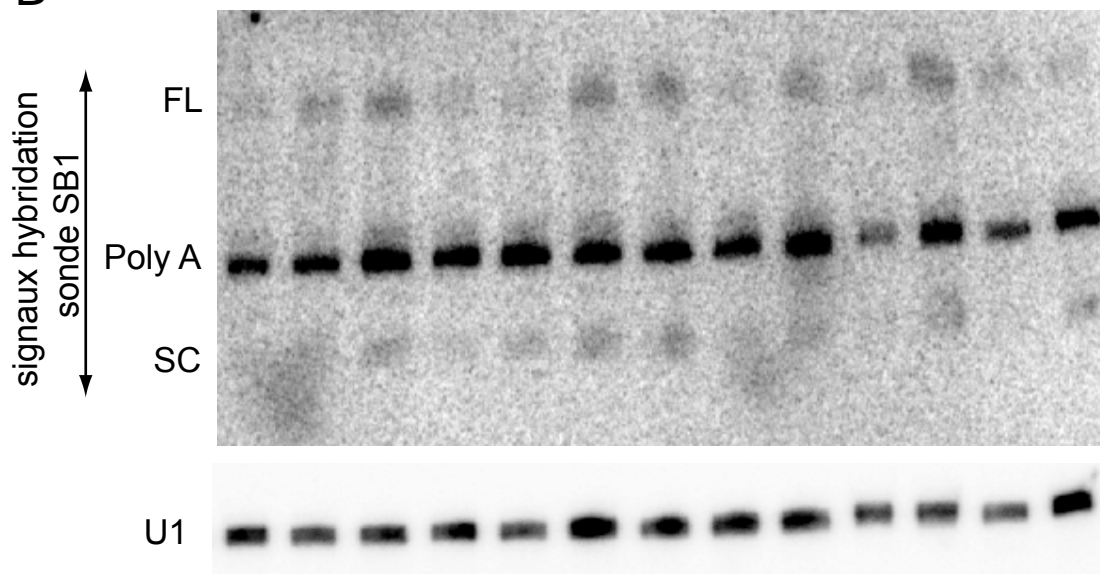


Figure 40: Impact de l'infection virale sur la transcription de l'élément SINE SB1.

A: Quantification de la quantité de transcrit du SINE SB1 chez les plantes infectées et les plantes contrôles. Hybridation Northern avec les sondes SB1 et actine.

B: Hybridation des sondes SB1 et U1 après séparation sur gel de polyacrilamide

Les plantes révélées positives à la première amplification PCR sont indiquées en caractères gras.

c. *Impact de l'infection virale sur la transcription de l'élément SINE SB1 dans un contexte hétérologue.*

Nous avons réalisé cette étude en utilisant comme fond génétique une lignée de plante d'*Arabidopsis* appelée C3I18 (Pelissier *et al.* 2004). Cette lignée a été créée au laboratoire par T. Pélissier et a la particularité de présenter dans son génome une copie du SINE SB1 de *Brassica napus*. Cet élément SINE appartient à une famille qui est normalement absente du génome d'*Arabidopsis* et le locus introduit, appelé locus Na7, présente toutes les caractéristiques d'un locus fondateur. Le locus Na7 est la seule copie du SINE SB1 à être conservée dans toutes les espèces de *Brassica* testées (Tatout *et al.* 1999). Chez *Brassica napus*, la séquence du SINE SB1 présente au locus Na7 correspond au transcrit majeur détecté *in vivo* (Arnaud *et al.* 2001, Deragon *et al.* 1996). En effet, ce locus contient, en amont du SINE, des séquences amplificatrices de la transcription, qui lui permettent d'échapper partiellement à la répression transcriptionnelle (Arnaud *et al.* 2001).

Dans la lignée cellulaire d'*Arabidopsis*, le locus Na7 est transcriptionnellement actif et les transcrits pleine longueur, poly(A) terminal et cytoplasmique court du SINE SB1 peuvent être visualisés par hybridation Northern (Pelissier *et al.* 2004). Le SINE SB1 étant normalement absent du génome d'*Arabidopsis*, l'ensemble des transcrits détectés proviennent du transgène Na7. L'utilisation de cette lignée cellulaire, nous permet donc de nous affranchir du problème de co-transcription dans le cas particulier de l'élément SINE SB1.

Pour tester les conséquences du stress viral sur l'expression du SINE SB1 de *Brassica napus* présent dans les plantes utilisées, une sonde spécifique de cet élément a été utilisée. Comme précédemment, les ARN actine et U1 ont servi de standards pour comparer les échantillons entre eux (Figure 40A). Chez les plantes contrôles, ce niveau relatif d'accumulation de l'ARN SB1 par rapport à actine apparaît relativement stable, les plantes C1, C2 et C3 étant groupées entre 0,75 et 0,88. Seule la plante C8 présente une valeur plus basse de 0,25. Pour les plantes infectées, on peut constater qu'une valeur relative supérieure à celle des plantes contrôles est observée pour 6 des plantes infectées (n°3, 4, 5, 6, 7 et 9). La plante 8 qui a été identifiée comme non infectée (Figure 40A), et la plante 2 montrent une valeur comparable à celle des contrôles C1, C2 et C3 alors que la plante 1 présente elle un niveau similaire au contrôle C8. Il faut cependant noter que la variation maximale observée pour la

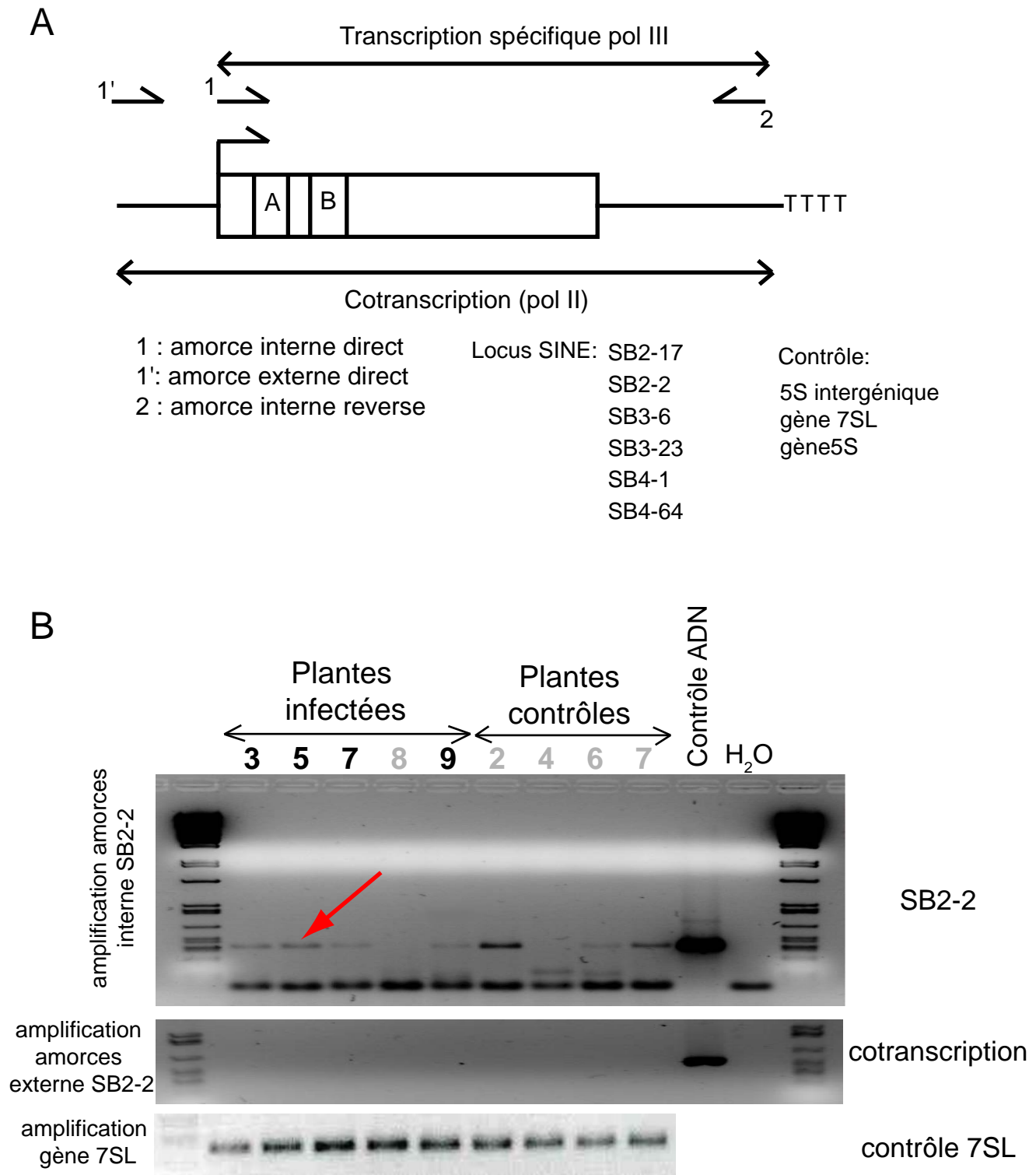


Figure 41: Etude de l'impact d'une infection virale sur la transcription des éléments SINE d'*Arabidopsis*.

A: Principe de l'analyse de RT-PCR: amorces utilisées, loci étudiés et contrôles de l'amplification.

B: Résultats de l'amplification du locus SB2-2 (indiqué par la flèche rouge). Un produit aspécifique de plus faible poids moléculaire est amplifié de manière équivalente dans chacune de réactions. L'amplification 7SL est utilisé comme standard pour la quantification.

plante infectée n°7 par rapport aux plantes contrôles C1, C2 et C3 est faible (environ 2 ; Figure 40A), ce qui indique que s'il existe un impact de l'infection sur l'expression du SINE SB1 il apparaît limité.

La taille des fragments hybridant avec la sonde SB1 étant faible (de 150 à 220 nucléotides), nous avons voulu répéter cette expérience après séparation des ARN des plantes infectés sur un gel de polyacrylamide. Après hybridation avec la sonde SB1 on peut visualiser les trois principales formes du transcrit SB1 qui s'accumulent dans la cellule (Figure 40B). Ces formes correspondent à l'ARN pleine longueur (FL) et à deux formes matures plus courtes appelées poly(A) et SC. On peut observer en premier lieu que d'un point de vue qualitatif le profil d'hybridation ne semble pas varier entre les différentes plantes, qu'elles soient infectées ou non. Après hybridation avec la sonde U1 (Figure 40B), le niveau d'accumulation de la forme majoritaire poly(A) de SB1 a été normalisé par rapport à U1 (Figure 40B). Pour trois des plantes (3, 5 et 9), cette accumulation est toujours supérieure à celle des contrôles mais reste cependant limitée à une variation maximale de l'ordre de 2 fois pour les plantes 3 et 5. Cette expérience confirme une absence de variation significative dans l'accumulation du transcript SB1 entre les plantes contrôles et infectées.

d. Impact sur l'expression des loci SINE d'Arabidopsis thaliana.

Au sein de leur génome, les SINE sont généralement fortement réprimés. Cependant, il a été décrit qu'un stress pouvait induire spécifiquement la transcription de certains loci SINE (cf. paragraphe VII de la synthèse bibliographique). Nous avons donc étudié l'impact de l'infection virale sur la transcription de certains loci SINE endogène des familles SB2, SB3 et SB4 d'*Arabidopsis thaliana*. La stratégie de RT-PCR semi-quantitative utilisée pour identifier une transcription pol III spécifique des loci SINE est montrée en Figure 41A. Une amplification avec les amorces 1 et 2 internes au transcrit SINE indique que l'élément est transcrit. L'absence d'amplification avec les amorces 2 interne et 1' externe démontre que le transcrit n'est pas dû à un événement de cotranscription. Les ARN de certaines plantes infectées et des plantes contrôles correspondantes ont été utilisés et nous avons testé deux loci pour chacune des trois familles SINE, qui contiennent des éléments avec un promoteur pol III potentiellement fonctionnel. L'absence d'amplification de la région intergénique non transcrite

du gène 5S nous a permis de montrer l'absence d'ADN génomique dans nos échantillons ; l'amplification d'une région du gène 7SL a été réalisée pour normaliser la quantité d'ADNc dans chaque échantillon. Le contrôle 7SL a été obtenu après un nombre de cycle PCR restreint (21 cycles) ; ceci correspond à des conditions permettant de se situer dans la phase exponentielle d'amplification et donc de normaliser la quantité d'ADNc entre chaque PCR

Pour les loci SB3-6, SB3-23 et SB4-1, aucune amplification n'a pu être obtenue sur les plantes infectées et contrôles (non montré). Un exemple typique des résultats obtenus avec les trois autres loci (SB2-2, SB2-17 et SB4-64) est montré avec le locus SB2-2 sur la Figure 41B. Dans nos conditions d'amplification la présence de transcrits pol III SB2-2 a été clairement détectée pour les plantes infectées 3, 5, 7 et 9 mais également pour les contrôles (C2, C6 et C7). Après dosage par rapport aux signaux 7SL (non montré), il apparaît que l'intensité relative des signaux correspondant aux plantes infectées 3, 5, 7 et 9 n'est pas supérieure aux valeurs obtenues pour les plantes contrôles. L'ensemble de ces résultats indique que l'infection virale ne semble pas avoir eu d'effet inducteur majeur sur l'expression des SINE testés.

I.2.2) Impact de l'expression de la protéine CLINK sur la transcription.

Les données présentées dans l'article 1 montre que l'expression de la protéine CLINK conduit à l'inactivation de la fonction de contrôle du cycle cellulaire de la protéine RB. Or chez les mammifères, RB a aussi comme fonction de contrôler la transcription des gènes transcrit par de la pol I et la pol III (cf. paragraphe XI de la synthèse bibliographique). Cependant, l'infection virale n'a pas permis de détecter une variation significative de l'accumulation des transcrits SINE et des autres transcrits pol III étudiés (cf paragraphe I.2.1 de la partie résultat). Il est possible que ce résultat soit dû à un effet de « dilution » car il est envisageable que toutes les cellules n'aient pas été systématiquement infectées. Il est également concevable que l'expression de la protéine CLINK à lieu à un moment précis de l'infection de la plante par le virus. Ainsi, nous n'avons peut-être pas regardé pendant que l'expression de CLINK est maximale dans le tissu infecté. Pour tester ceci nous, avons donc regardé directement l'effet de l'expression de la protéine CLINK *in vivo*. Pour cela, nous avons donc voulu savoir si l'inhibition de la fonction RB par la protéine CLINK chez la

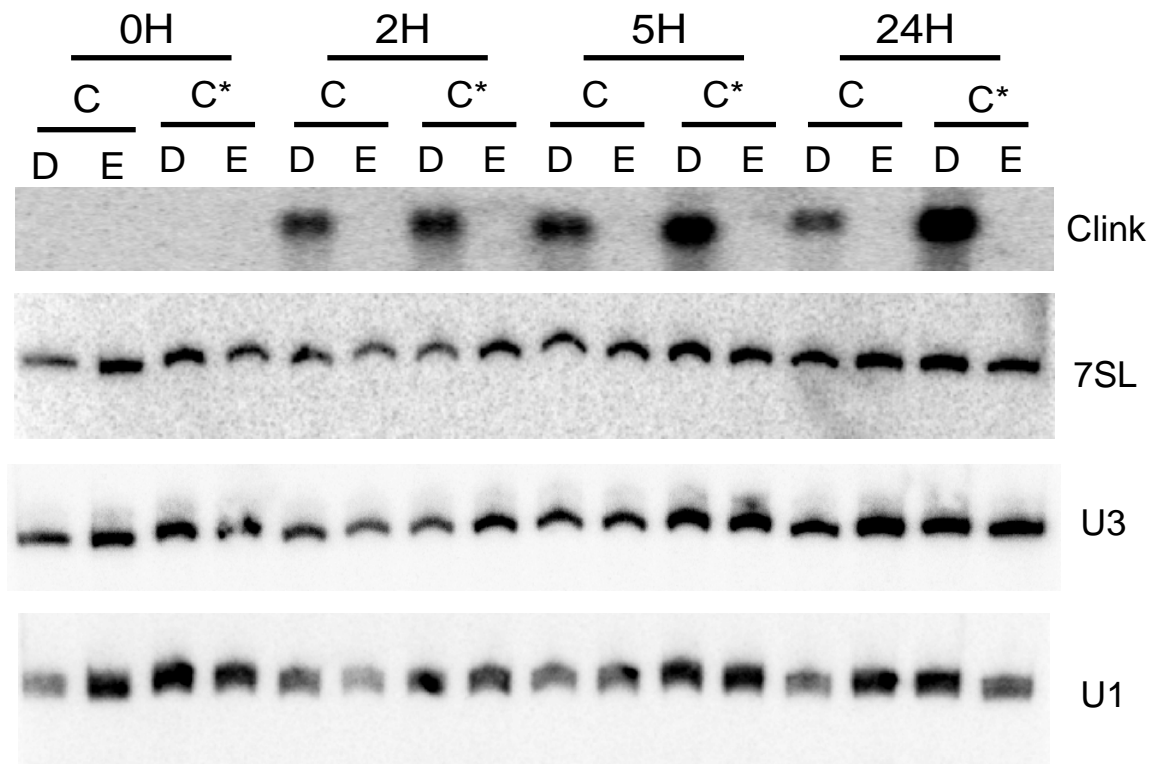


Figure 42: Impact de la protéine Clink sur la transcription pol III.

Hybridation par Northern blot d'ARN extraits de feuilles matures de plantes transgéniques pour la protéine Clink (C) ou pour Clink mutée dans le domaine d'interaction avec Rb (C*). L'expression du transgène est induite en présence de dexaméthasone (D) pour une période de 2 à 24h.

plante pouvait conduire à une dépression de la transcription pol I et pol III en générale et en particulier la transcription pol III des éléments SINE.

a. Induction de l'expression de CLINK ou CLINK mutant.

L'induction de l'expression de la protéine CLINK ou CLINK mutant (CLINK*) par la dexaméthasone a été effectuée sur les feuilles des plantes transgéniques présentées dans l'article 1. Deux séries d'expériences (A et B) distinctes ont été réalisées pour chacune des lignées CLINK et CLINK* selon les conditions présentées par la Figure 42. Dans le cadre de notre analyse, l'expression de la protéine CLINK a été suivie au niveau ARN par hybridation Northern blot avec une sonde spécifique du transcrit Clink sur les ARN extraits de nos plantes. Comme le montre la Figure 42, un signal correspondant à l'apparition de transcrits Clink ou Clink* apparaît dès 2H d'induction avec la solution de dexaméthasone. Pour les feuilles incubées avec la solution contrôle éthanol, on observe comme attendu une absence de l'expression des transgènes. La série B réalisée dans les mêmes conditions permet une induction similaire à celle observée pour la série A.

b. Quantification de l'expression des gènes pol III et pol I par Northern blot.

La membrane utilisée pour la vérification de l'induction a ensuite été hybridée avec différentes sondes spécifiques de gènes transcrits par l'ARN polymérase III (7SL, U3, 5S, et ARNt thréonine) et l'ARN polymérase I (5,8S). Les signaux obtenus ont été normalisés en utilisant les sondes spécifiques U1 et actine. La Figure 42 présente les résultats obtenus. On peut observer que la variation de la quantité du transcrit 7SL pour la lignée CLINK après induction (DEX) ou non (Ethanol) est inférieure à un facteur 1,5 et ceci avec tous les temps d'incubation testés (de 0 à 48h). Ce niveau de transcrit est également similaire à celui observé avec les lignées CLINK* induites et non induites. Pour les autres transcrits pol III étudiés (U3, 5S et ARNt) ainsi que pour le transcrit pol I 5,8S, aucune variation supérieure à un facteur 2 n'a pu être observée en normalisant le signal obtenu avec celui des transcrits actine ou U1.

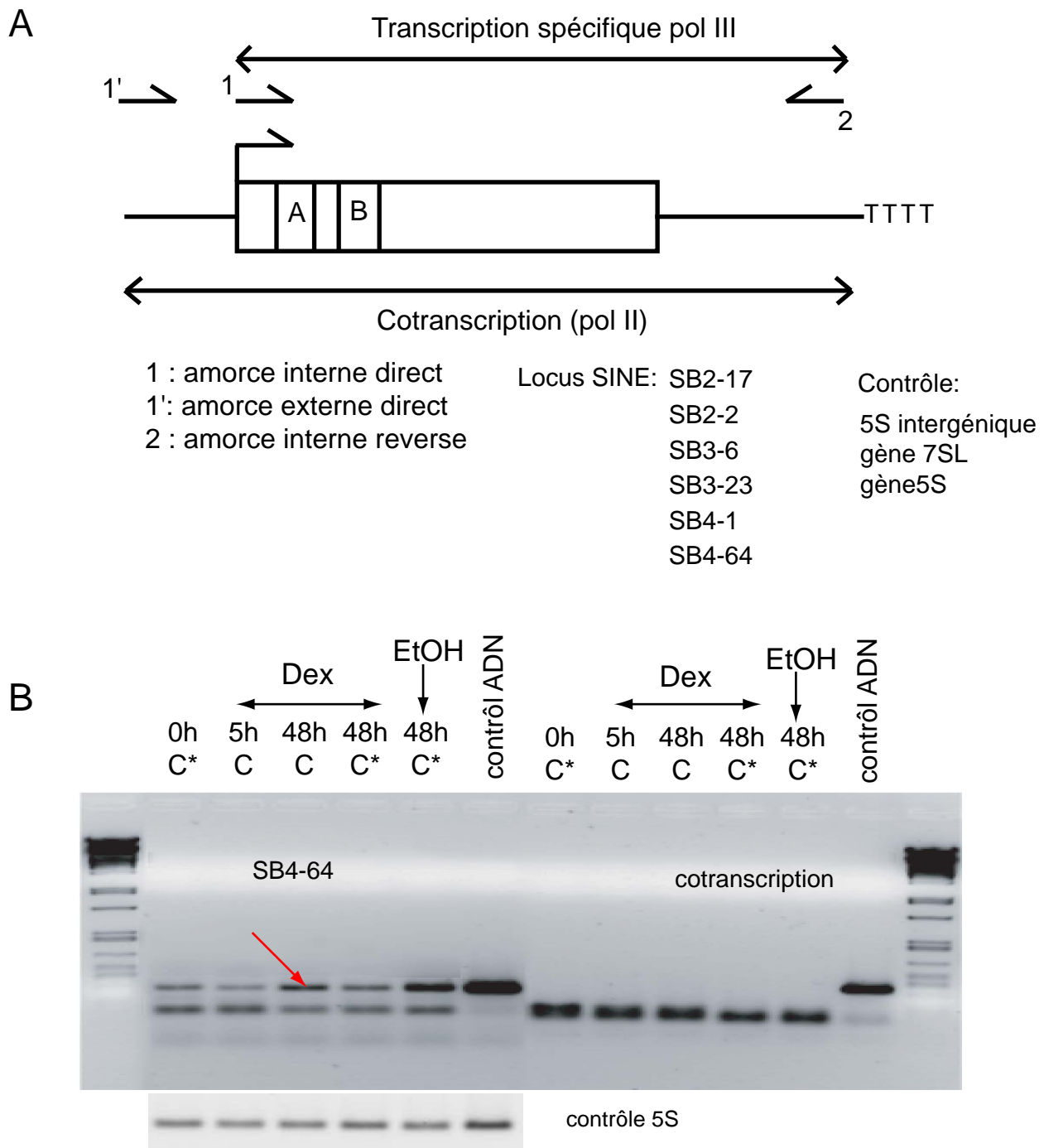


Figure 43: Impact de la protéine Clink sur l'expression de SINE d'*Arabidopsis thaliana*.

A: Principe de l'analyse de RT-PCR: amorces utilisées, loci étudiés et contrôles de l'amplification.

B: Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression des SINE endogènes: exemple du locus SB4-64 (indiqué par la flèche rouge). Un produit aspécifique de plus faible poids moléculaire est amplifié de manière équivalente dans chacune de réactions. L'amplification 5S est utilisé comme standard pour la quantification.

Les mêmes hybridations réalisées sur la série B ne permettent pas de mettre en évidence, tout comme pour la série A, un effet potentiel de la protéine CLINK sur la transcription pol III ou pol I

c. Détection des transcrits SINE endogène par RT-PCR

Un éventuel impact de la protéine CLINK sur l'expression spécifique des éléments SINE a été analysé par RT-PCR comme pour l'infection virale (Figure 41). L'intensité des bandes amplifiées pour les éléments SINE a été normalisée avec comme standard le gène 5S. Les résultats de cette étude montrent deux cas de figures. Pour les loci SB2-2, SB2-17 et SB4-64 (Figure 43) on a pu mettre en évidence la présence de transcrits pol III à la fois chez les plantes induites et non induites dans les lignées CLINK et CLINK*. Le résultat de la quantification est similaire pour les 3 loci et est présenté pour le locus SB4-64 (Figure 43). La valeur relative du signal SB4-64 est de 0,4 et 0,9 pour les plantes exprimant la protéine CLINK (5h et 48h C dex) alors qu'elle varie entre 0,55 et 1,4 pour les différents contrôles utilisés, ce qui indique une absence d'impact de l'induction de CLINK sur l'expression de ces loci. Pour les loci SB3-6, SB3-23 et SB3-1 aucune amplification n'a été détectée chez les plantes CLINK et CLINK* induites et non induites.

L'expression de la protéine virale CLINK dans des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* ne permet donc pas une levée de répression de ses loci SINE.

II. Caractérisation de la protéine GCN2 chez *Arabidopsis thaliana*.

II.1. Article 2 : *Arabidopsis* eIF2 α kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding.

La seconde partie de notre étude a porté sur l'étude de l'impact de l'ARN SINE sur la phosphorylation d'eIF2 α et sur la traduction. Chez la levure et chez les mammifères, la phosphorylation d'eIF2 α est un mécanisme majeur dans l'inhibition de la synthèse protéique en réponse à différents stress tel que la carence nutritionnelle. Comme la protéine GCN2 est l'unique kinase d'eIF2 α chez *Arabidopsis*, nous avons voulu déterminer dans un premier

temps si GCN2 avait conservé cette fonction chez la plante et si la protéine était activée en réponse aux mêmes stimuli.

Pour cela, nous avons à notre disposition un anticorps spécifique d'eIF2 α phosphorylée. Son utilisation nous a permis de montrer que la protéine kinase GCN2 d'*Arabidopsis* était activée en réponse à de nombreux stress comme la carence en purine et en acides aminés, l'irradiation UV, le choc thermique et à la suite d'une blessure. L'utilisation d'une plante *gcn2* mutante nous a ensuite confirmé que la phosphorylation d'eIF2 α en réponse à ces stress dépendait bien de la présence d'une protéine GCN2 fonctionnelle. GCN2 est d'ailleurs essentielle pour la croissance de la plante en condition de stress et, comme chez la levure, l'activation de la protéine conduit à une forte diminution de la synthèse protéique.

Ainsi nos résultats suggèrent que la réponse générale à la carence en acides aminés est conservée entre la levure et les plantes. Cependant, il semble que la kinase GCN2 de plante a évolué afin de remplir une fonction plus générale dans la détection et la réponse à des stress plus variés. Les végétaux sont des organismes fixés au sol par leurs racines ce qui les rend très dépendants des conditions de leur environnement. Ainsi les plantes sont souvent confrontées à des variations de température, à la sécheresse, à des irradiations UV et subissent enfin des blessures des animaux et des insectes herbivores. Les plantes ont donc développé des voies de signalisation leur permettant de réagir contre ces agressions. Les hormones végétales ont un rôle prépondérant au sein de ces voies de signalisation.

Ainsi, l'acide jasmonique est une hormone qui intervient dans la réponse aux pathogènes mais aussi dans la réponse à des stress environnementaux comme la blessure, la sécheresse, les insectes herbivores et l'exposition à l'ozone (Berger 2002; Howe and Jander 2008). L'acide abscissique est une hormone produite à la suite de la sécheresse, d'une infection virale, du froid et en condition de forte salinité (Schroeder and Nambara 2006; Mauch-Mani and Mauch 2005). La production d'éthylène ou de son précurseur l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) est régulé en réponse à des stimuli environnementaux comme des stress biotiques (attaque par des pathogènes) et abiotique (blessure, hypoxie, ozone, gel et froid) (Wang *et al.* 2002; Howe and Jander 2008). Enfin l'acide salicylique intervient également dans la réponse aux pathogènes, à l'ozone et au froid (Shah 2003; Alvarez 2000).

Ces différentes hormones sont donc produites en réponse à des stimuli variés et permettent l'expression de gènes de défenses. Les voies de signalisation communiquent entre

elles formant un réseau très complexe et il reste à déterminer quel sont les récepteurs à l'origine de la régulation de la biosynthèse de ces hormones.

L'activation de GCN2 à la suite d'une blessure mais également après exposition à des hormones végétales produites normalement à la suite de stress biotiques et abiotiques suggère que cette enzyme pourrait jouer un rôle dans certains stress spécifiques aux plantes comme la défense contre les insectes herbivores.

Ce travail a donné lieu à la publication d'un article inséré ci-après.

***Arabidopsis* eIF2 α kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions
and is activated by wounding**

Sébastien Lageix¹⁻³, Elodie Lanet², Marie-Noëlle Pouch-Pélissier¹, Marie-Claude Espagnol³,
Christophe Robaglia², Jean-Marc Deragon^{1*} and Thierry Pélissier^{1*}

¹Université de Perpignan Via Domitia, CNRS-IRD UMR5096 LGDP, 52 avenue Paul Alduy
66860 Perpignan Cedex France.

²Université Luminy, CNRS-CEA UMR6191 LGBP, 13009 Marseille Cedex 9 France

³Université Blaise Pascal, CNRS UMR6547 BIOMOVE, 24 Avenue des Landais, 63177
Aubière France.

* J. M. Deragon and T. Pélissier contributed equally to this study

Running title: Functional characterization of a plant GCN2 kinase

Corresponding author:

Jean-Marc Deragon

Université de Perpignan, 52, Av. Paul Alduy

LGDP, UMR CNRS-IRD-UP 5096

66860 Perpignan cedex

Phone: 33 (0)4 68 66 17 73

Fax: 33 (0)4 68 66 84 99

Email: jean-marc.deragon@univ-perp.fr

Abstract

Background: Phosphorylation of eIF2   provides a key mechanism for down-regulating protein synthesis in response to nutrient starvation or stresses in mammalian and yeast cells. However, this process has not been well characterized in plants

Results: We show here that in response to amino acid and purine starvations, UV, cold shock and wounding, the *Arabidopsis* GCN2 kinase (AtGCN2) is activated and phosphorylates eIF2  . We show that AtGCN2 is essential for plant growth in stress situations and that its activity results in a strong reduction in global protein synthesis.

Conclusions: Our results suggest that a general amino acid control response is conserved between yeast and plants but that the plant enzyme evolved to fulfill a more general function as an upstream sensor and regulator of diverse stress-response pathways. The activation of AtGCN2 following wounding or exposure to methyl jasmonate, the ethylene precursor 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and salicylic acid, further suggests that this enzyme could play a role in plant defense against insect herbivores.

Key words: eIF2   phosphorylation, translational regulation, biotic and abiotic stress, protein synthesis, plant.

Background

Phosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) provides a key mechanism for down-regulating protein synthesis in response to nutrient starvation or stresses [1, 2]. Vertebrates use four different eIF2 α -kinases (PKR, PERK, HRI and GCN2) to respond to various stresses, and typically one kinase has a predominant role in response to a specific cellular stress condition. For example, in mammals, GCN2 is the primary eIF2 α -kinase in response to nutrient limitation [3], PERK modulate gene expression in response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum (ER) [4], PKR participates in an antiviral pathway mediated by interferon [5], and HRI couples protein synthesis (predominantly globin) to the availability of heme in the erythroid cell lineage [6]. However, this specialization of function is not complete and, for example, GCN2 is a secondary eIF2 α -kinase in response to ER stress in mouse [7]. Arthropods make a more or less specialized use of eIF2 α -kinases. The mosquito *Anopheles gambiae* has three distinct enzymes (HRI, PERK and GCN2) while *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* have only two (PERK and GCN2) [8]. The situation is similar for fungi since *Schizosaccharomyces pombe* has three enzymes (two distinct HRI and a GCN2) while *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* have a single eIF2 α -kinase (GCN2) [8].

In amino acid starved *S. cerevisiae* cells, GCN2-dependent eIF2 α phosphorylation leads to a general down regulation of protein synthesis and to the increased translation of the GCN4 mRNA [2]. Following translation, the GCN4 transcriptional activator can induce the transcription of more than 500 genes, including the majority involved in amino acid synthesis. Uncharged tRNAs that accumulate during amino acid starvation activate GCN2 by binding to a histidyl-tRNA synthetase-related domain located C-terminal to the kinase domain [2]. *S. cerevisiae* GCN2 is activated not only by nutrient limitation including amino acid, purine and

glucose deprivation, but also by high concentration of sodium and by the immunosuppressant rapamycin [2].

In plants, the lower dissociation constant of eIF2 for GDP compared to yeast or mammals have led several years ago to the assumption that plants do not use phosphorylation of eIF2 α as a mean to regulate translation [9]. Furthermore, the observation that starvation for aromatic or branched amino acids did not initiate a general response have also led to the suggestion that, in contrast to yeast, such general amino acid response may not exist in plants [10]. Therefore the physiological significance of eIF2 α phosphorylation in plants is largely unknown. More recently, a GCN2-like enzyme (AtGCN2) has been identified in *Arabidopsis thaliana* and was shown to restore the growth of a yeast *gcn2* mutant in the presence of an inhibitor of amino acids biosynthesis [11]. AtGCN2 was also shown to be activated in plants by amino acid deprivation conditions [12].

In this work, we show that in response to several stresses, including amino acid and purine starvations, UV, cold shock and wounding, *Arabidopsis* GCN2 kinase is activated and phosphorylates eIF2 α . We show that GCN2 is essential for plant growth in stress situations and that this activity is linked to a strong reduction in global protein synthesis. The activation of GCN2 following wounding or exposure to methyl jasmonate, ACC and salicylic acid, further suggests that this enzyme could play a role in plant defense responses to insect herbivores and may represent a key but yet uncharacterized player linking biotic and abiotic stresses.

Results and Discussions

Arabidopsis and rice have a single eIF2 α kinase

In addition to the presence of a GCN2 enzyme, higher plants have been proposed to contain a double-stranded RNA-dependent protein kinase with biochemical properties of the

mammalian PKR [13-15]. Using the protein kinase domain of the yeast and *Arabidopsis* GCN2 and of the human PKR, PERK and HRI enzymes, we searched the *Arabidopsis* genome for the presence of additional eIF2 α kinases. GCN2, PRK, PERK and HRI protein kinase domains were used in a BLASTP analysis against the TAIR 8.0 *Arabidopsis* proteins (<http://www.arabidopsis.org>) and, in each case, fifty proteins with the highest E value were collected. Using this approach, we produced a list of 138 non-redundant kinases (out of the more than 1000 *Arabidopsis* kinases) that most closely resemble eIF2 α kinases (Figure S1). Using a phylogenetic approach, we compared these 138 kinase domains to yeast, human and mouse eIF2 α kinase domains. Two *Arabidopsis* kinases were found to form a statistically significant cluster with known eIF2 α kinases (Figure S1): one is AtGCN2 (AT3G59410) while the other is annotated as a Wee1-like kinase (AT1G02970) [16]. To evaluate the capacity of the Wee1-like protein to bind to eIF2 α , we analyzed in more detail the alignment of this enzyme to the other eIF2 α kinases (Figure S2). We observed that three essential structural characteristics of eIF2 α kinases are not present in the Wee1-like kinase: a large insert (more than 30 amino acids) between the conserved kinase domains IV and V [17], a threonine in a putative autophosphorylation site (position 446 for the human PKR) [18] and a threonine at the end of domain IX (position 487 for the human PKR) that is critical for the substrate specificity [18]. Therefore, although the *Arabidopsis* Wee1-like enzyme possess a high degree of homology to eIF2 α kinases, as previously noted for the human Wee1 [19], it is unlikely to bind to eIF2 α . We conclude that *Arabidopsis* likely possesses a single eIF2 α kinase of the GCN2 type. The same conclusion was obtained using this approach to analyze the rice genome (data not shown) suggesting that higher plants only contain a GCN2-like eIF2 α kinase.

***Arabidopsis thaliana* GCN2 can phosphorylate eIF2 α in amino acid deprivation conditions**

To investigate the role of AtGCN2, we first decided to confirm whether amino acid depletion, a stress known to activate yeast GCN2, is actually inducing eIF2 α phosphorylation in *Arabidopsis*. As shown in Figure 1A, eIF2 α phosphorylation is induced after aromatic or branched amino acid deprivation (a situation generated by exposing plants to glyphosate or chlorsulfuron respectively [20]). eIF2 α phosphorylation occurs only 4 hours after disrupting the branched amino acid synthesis pathway and peaks after 6 hours of treatment (Figure 1B). This induction is completely suppressed by adding branched amino acids (isoleucine, leucine and valine) to the growth medium (Figure 1C), suggesting that eIF2 α phosphorylation directly results from the amino acid deficiency and not from an indirect drug-induced effect. eIF2 α phosphorylation is completely dependent on the presence of GCN2. Indeed, no phosphorylation was detected in a GCN2 null mutant line after aromatic and branched amino acid deprivation (Figure 1A and see Figure S3 for a description of the *gcn2* mutant line). The absence of a functional GCN2 also impaired the basal level of phosphorylation detectable in untreated wild type plants (Figure 1A). Moreover, the introduction of an intact copy of AtGCN2 in the *gcn2* mutant line allowed the rescue of eIF2 α phosphorylation in response to amino acid deprivation (Figure 2). These results confirm that AtGCN2 is the only *Arabidopsis* kinase involved in eIF2 α phosphorylation in amino acid starvation conditions.

Characterization of other stresses leading to eIF2 α phosphorylation in *Arabidopsis*

Purine deprivation is known to activate yeast GCN2 [2]. We observed that purine deprivation (a situation generated by exposing plants to 8-azaadenine (azA) [21]) is also inducing eIF2 α phosphorylation in *Arabidopsis* (Figure 1A). Interestingly, this phosphorylation appears within 2 hours after purine limitation (Figure 1D) and likely results of a reduction in tRNA

aminoacylation efficiency leading to the accumulation of uncharged tRNAs [2]. eIF2 α is also quickly phosphorylated after UV irradiation (Figure 1A). This response begins only 20 minutes after irradiation, with a maximum of phosphorylation after 1 hour and a return to basal levels after 6 hours (Figure 1E). Again, both phosphorylation events are completely dependent on the presence of GCN2 as no eIF2 α phosphorylation could be detected in the mutant *gcn2* line in stress condition (Figure 1A). Although oxidative and osmotic stresses are known to activate yeast GCN2 [2, 22], we were not able to activate AtGCN2 using NaCl or H₂O₂ (see Figure 3B). Also, heat shock did not lead to eIF2 α phosphorylation in *Arabidopsis* (data not shown) confirming previous results obtained in wheat [23]. In contrast, cold shock, plant wounding, methyl jasmonate, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and salicylic acids were efficient, plant-specific inducer of GCN2-dependent eIF2 α phosphorylation (Figure 3 and Figure S4). Jasmonate acid (JA) and related signaling compounds such as methyl jasmonate are ubiquitous signals for tissue injury and for the subsequent activation of defense response to insect herbivores [24]. ACC is a precursor of ethylene, which also affects the expression of defensive proteins and secondary metabolites in response to insect herbivores [24]. Both ACC and JA accumulate simultaneously in response to insect herbivores and form a conjugate (JA-ACC) that was proposed to coordinately regulate the plant defense response [24]. Finally, salicylic acids is well known to regulate the plant defense response to lepidopteran insects [24]. The common capacity of these three key hormones to induce eIF2 α phosphorylation suggests that AtGCN2 participates in the plant defense response to insect herbivores.

The AtGCN2 activity is not regulated by the TOR pathway

TOR (target of rapamycin) protein kinase is a central regulator of cell growth in response to nutrient and growth factors [21]. A TOR homolog has been identified in *Arabidopsis*

(AtTOR) and has been implicated in embryo development, meristem-driven cell growth, osmotic stress inhibition and the stimulation of mRNA translation [25]. In yeast, phosphorylation of eIF2 α by GCN2 is responsible for about 50% of the inhibition of translation initiation following the use of the TOR inhibitor rapamycin, suggesting that an important cross-talk exist between TOR and GCN2 pathways [21]. In *Arabidopsis*, the RNAi inhibition of the TOR pathway also results in a strong inhibition of translation initiation while TOR overexpressing lines present an increase in translation initiation efficiency [25]. To evaluate the implication of AtGCN2 in this regulation, we analyzed the level of eIF2 α phosphorylation in AtTOR RNAi-silenced (35-7, 65-1) and overexpressing (G548, G166) lines in normal and amino acid deprivation conditions (Figure 4). The partly silenced 35-7 and 65-1 lines show a significant decrease in the accumulation of AtTOR mRNA and a severe reduction in shoot and root growth while the two overexpressing G548 and G166 lines have opposite features (increase accumulation of AtTOR mRNA and a strong increase in shoot and root growth) [25]. No increase in eIF2 α phosphorylation was detected in unstressed TOR-silenced lines and a similar pattern of phosphorylation was observed in stressed TOR-silenced and overexpressing lines (Figure 4) suggesting that, in contrast to the yeast situation, no cross-talk exists between the TOR and GCN2 pathways in *Arabidopsis*.

GCN2 is essential for plant in stress conditions.

In a classical rich medium, *gen2* mutant plants do not have a particular phenotype compared to wild-type plants (Figure 5 and data not shown). However when they are exposed during their development to stresses such as amino acid starvation, *gen2* seedlings became much more sensitive compared to wild type seedlings. Indeed, 6 days after the beginning of amino acid starvation, the *gen2* plants appeared smaller and completely chlorotic (Figure 5). In contrast, wild type plants appear healthier and only slightly chlorotic after this period of time. To confirm the role of GCN2 during nutriment deprivation we tested the ability of

complemented *gcn2:GCN2* plants to develop in these conditions. As expected, *gcn2:GCN2* plants were able to grow identically to wild-type seedlings during amino acid deprivation (Figure 5). This confirms that AtGCN2 is essential for plant growth in this stress situation.

GCN2 activity induces a strong reduction in global protein synthesis

The impact of eIF2 α phosphorylation on the efficiency of mRNA translation was next evaluated. We observed a reduction in the abundance of high-molecular weight polysomes compared to monosomes in amino acids (Figure 6A) or purine (Figure S5) deprived wild type plants. This variation in the polysomes to monosomes ratio is diagnostic of a reduction in translation elongation rate and translation initiation efficiency caused by these stress conditions. In contrast, we found that amino acids (Figure 6A) or purine (Figure S5) deprived *gcn2* mutant overaccumulates high molecular weight polysomes compared to monosomes. This suggests that, in these stress conditions, *gcn2* mutant can no longer prevent translation initiation in a context where translation elongation is slowed down. In support to this conclusion, we observed a marked decrease in the amount of neo-synthesized proteins by wild type plant during purine deprivation (Figure 6B), a decrease that is much weaker in *gcn2* mutant plants (Figure 6B). Globally, these results suggest that the GCN2-dependent increase in eIF2 α phosphorylation under amino acids or purine deprivation conditions, results in a strong reduction of protein synthesis.

Conclusion

Our data indicate that AtGCN2 is important for plant growth in stress situations, likely through the general down regulation of mRNA translation. For the moment, it is not known if eIF2 α phosphorylation by AtGCN2 can lead to the selective stimulation of specific mRNA translation like this is the case for the yeast GCN4 [2] or mammalian ATF4 mRNAs [1]. The strong activation of AtGCN2 following wounding and exposure to key hormones suggests

that this enzyme evolved to play a role in plant defense responses to insect pathogens and may represent a key but yet uncharacterized player linking biotic and abiotic stresses. Therefore, while mammals use four different eIF2 α kinases to respond to a large variety of biotic and abiotic stresses, plants apparently achieve a similar result with a single, GCN2-like enzyme.

Methods

Plant material, growth condition and stress treatments. Wild-type and *gcn2* mutated *Arabidopsis thaliana* plants are from the Landsberg (ler-0) ecotype. The *gcn2* insertion line was obtained from RIKEN Genomic Science Center (<http://www.riken.jp/engn>). Sterile seeds were germinated on solid Murashige and Skoog (MS) medium containing 1% sucrose (w/v) and cultured in a 16-h-light/8-h-dark cycle for 10 days at 23°C. When appropriate, Chlorsulfuron, glyphosate, 8-azaadenine, methyl jasmonate, salicylic acid, ACC and branched amino-acid were added to the medium at a final concentration of 0.6 μ M, 1.5mM, 50 μ g/ml, 25 μ M, 0.6mM, 50 μ M and 5mM respectively. For the UV stress, seedlings were irradiated with UV light at 50mJ/m² by using a UV cross-linker (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Plant wounding was performed by crushing the leaf across the midrib with a haemostat. For the cold shock treatment, seedlings were transferred at 4°C during 2h followed by 2h back in the growth chamber at 23°C. Heat shock were performed at 42°C during 2h followed by 2h back in the growth chamber at 23°C. For osmotic and oxidative stresses, the seedlings were placed in solutions containing 250mM NaCl or 1mM H₂O₂ during the time indicated.

Immunoblot analysis of eIF2 α phosphorylation. Western blots were probed using a phosphospecific anti-eIF2 α rabbit monoclonal antibody (Epitomics, Burlingame, CA ; 1/1,000 dilution). After incubation with a horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit secondary antibody (Sigma 1/5,000 dilution) immunoblots were developed by using the ECL

Plus Western Blotting detection reagents (GE Healthcare Bio-Sciences). Chemiluminescence was visualized with a VersaDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Equal loading of protein were confirmed by reprobng the membranes with a mouse monoclonal anti- α -tubulin (Sigma 1/5,000 dilution).

Polysome preparation and detection of neo-synthesized proteins in normal and stress situation. For polysome preparation, seeds were sown in liquid medium, incubated 48h at 4°C, and grown under constant light during 10 days at 23°C. Chlorsulfuron was added, and after 2 or 4 hours, the ribosomal pellet fraction was prepared from wild-type (WT) or *gcn2* mutant seedlings as described in [25]. Polysome profiles were displayed on sucrose gradients and profiles recorded at 260 nm. For the detection of neo-synthesized proteins, treated (8-azaadenine) or untreated seedlings were transferred into 1ml of MS medium containing 50 μ Ci of 35 S-labelled methionine. After two washes with MS medium, total proteins were extracted and 35 μ g of protein were separated on SDS-PAGE. Gels were stained with Coomassie blue or dried and autoradiographed using a PhosphorImager (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Authors' contributions

SI carried out the molecular genetic studies on GCN2, participated in the polysome profile analysis and drafted the manuscript. EL did the polysome profile analysis and, with CR, helped in its interpretation. MNP and MCE provided technical help on the molecular genetic work. JMD and TP conceived the study, participated in its coordination and final writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgement

This work was supported by the CNRS and the Université of Perpignan.

References

1. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG: **Coping with stress: eIF2 kinases and translational control.** *Biochemical Society transactions* 2006, **34**(Pt 1):7-11.
2. Hinnebusch AG: **Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast.** *Annual review of microbiology* 2005, **59**:407-450.
3. Zhang P, McGrath BC, Reinert J, Olsen DS, Lei L, Gill S, Wek SA, Vattam KM, Wek RC, Kimball SR *et al*: **The GCN2 eIF2alpha kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**(19):6681-6688.
4. Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D: **Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response.** *Annual review of cell and developmental biology* 2002, **18**:575-599.
5. Clemens MJ: **PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 1997, **29**(7):945-949.
6. Chen JJ: **Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias.** *Blood* 2007, **109**(7):2693-2699.
7. Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Lu D, Hai T, Harding HP, Wang X, Ron D, Cavener DR, Wek RC: **Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(3):1365-1377.
8. Zhan K, Narasimhan J, Wek RC: **Differential activation of eIF2 kinases in response to cellular stresses in Schizosaccharomyces pombe.** *Genetics* 2004, **168**(4):1867-1875.

9. Shaikhin SM, Smailov SK, Lee AV, Kozhanov EV, Iskakov BK: **Interaction of wheat germ translation initiation factor 2 with GDP and GTP.** *Biochimie* 1992, **74**(5):447-454.
10. Guyer D, Patton D, Ward E: **Evidence for cross-pathway regulation of metabolic gene expression in plants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(11):4997-5000.
11. Zhang Y, Dickinson JR, Paul MJ, Halford NG: **Molecular cloning of an arabidopsis homologue of GCN2, a protein kinase involved in co-ordinated response to amino acid starvation.** *Planta* 2003, **217**(4):668-675.
12. Zhang Y, Wang Y, Kanyuka K, Parry MA, Powers SJ, Halford NG: **GCN2-dependent phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor-2alpha in Arabidopsis.** *Journal of experimental botany* 2008, **59**(11):3131-3141.
13. Langland JO, Jin S, Jacobs BL, Roth DA: **Identification of a plant-encoded analog of PKR, the mammalian double-stranded RNA-dependant protein kinase.** *Plant Physiology* 1995, **108**:1259-1267.
14. Langland JO, Langland LA, Browing KS, Roth DA: **Phosphorylation of plant eukaryotic initiation factor-2 by the plant-encoded double-stranded RNA-dependent protein kinase, pPKR and inhibition of protein synthesis in vitro.** *The Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**:4539-4544.
15. Hiddinga HJ, Crum CJ, Hu J, Roth DA: **Viroid-induced phosphorylation of a host protein related to a dsRNA-dependent protein kinase.** *Science* 1988, **241**(4864):451-453.
16. De Schutter K, Joubes J, Cools T, Verkest A, Corellou F, Babiychuk E, Van Der Schueren E, Beeckman T, Kushnir S, Inze D *et al*: **Arabidopsis WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint.** *Plant Cell* 2007, **19**(1):211-225.

17. Hanks SK, Hunter T: **Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification.** *Faseb J* 1995, **9**(8):576-596.
18. Dey M, Cao C, Dar AC, Tamura T, Ozato K, Sicheri F, Dever TE: **Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition.** *Cell* 2005, **122**(6):901-913.
19. Chen JJ, Throop MS, Gehrke L, Kuo I, Pal JK, Brodsky M, London IM: **Cloning of the cDNA of the heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF-2 alpha) kinase of rabbit reticulocytes: homology to yeast GCN2 protein kinase and human double-stranded-RNA-dependent eIF-2 alpha kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(17):7729-7733.
20. Zhao J, Williams CC, Last RL: **Induction of Arabidopsis Tryptophan Pathway Enzymes and Camalexin by Amino Acid Starvation, Oxidative Stress, and an Abiotic Elicitor.** *Plant Cell* 1998, **10**:359-370.
21. Cherkasova VA, Hinnebusch AG: **Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2.** *Genes Dev* 2003, **17**(7):859-872.
22. Mascarenhas C, Edwards-Ingram LC, Zeef L, Shenton D, Ashe MP, Grant CM: **Gen4 Is Required for the Response to Peroxide Stress in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molecular biology of the cell* 2008.
23. Gallie DR, Le H, Caldwell C, Tanguay RI, Hoang NX, Browning KS: **The phosphorylation state of translation initiation factors is regulated developmentally and following heat shock in wheat.** *J Biol Chem* 1997, **272**(2):1046-1053.

24. Howe GA, Jander G: **Plant Immunity to Insect Herbivores**. *Annual review of plant biology* 2008, **59**:41-66.
25. Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolai M, Bedu M, Robaglia C, Meyer C: **The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation**. *EMBO reports* 2007, **8**(9):864-870.

Figure legends

Figure 1. AtGCN2 phosphorylates eIF2 α during amino-acid and purine deprivation or after UV irradiation. **A.** Immunoblot analysis of eIF2 α phosphorylation in wild-type (WT) or *gcn2* mutant seedlings, untreated (\emptyset), starved for amino acids with chlorsulfuron or glyphosate for 4h, starved for purine with 8-azaadenine (azA) for 4h or irradiated with UV. **B.** Time-course of eIF2 α phosphorylation in response to amino acid starvation induced by chlorsulfuron. **C.** Time-course of eIF2 α phosphorylation in presence of chlorsulfuron or in presence of chlorsulfuron associated with isoleucine, leucine and valine (ILV). **D.** Time-course of eIF2 α phosphorylation in response to purine starvation induced by azA. **E.** Time-course of eIF2 α phosphorylation in response to UV irradiation. Phosphorylation of eIF2 α was measured by using an antibody that specifically recognizes the phosphorylated form (upper panel). Levels of total protein were assayed by using an antibody that recognizes tubulin (lower panel).

Figure 2. Molecular complementation of the *gcn2* mutant line by the expression of AtGCN2. Immunoblot analysis of eIF2 α phosphorylation in wild type (WT), *gcn2* mutant or in three independent *gcn2* transgenic lines expressing an intact AtGCN2 (*gcn2:GCN2*). Seedlings were either untreated (\emptyset) or starved for branched amino acids with chlorsulfuron (chlor) for 6 hours.

Figure 3: Stress conditions leading to GCN2-dependent eIF2  phosphorylation in *Arabidopsis*. **A.** Immunoblot analysis of eIF2  phosphorylation in wild type (WT) or *gcn2* mutated seedlings. Seedlings were either left untreated ( ), starved for purine with azA, exposed to low temperature (cold shock) or wounded on their leaves or roots. **B.** eIF2  phosphorylation in wild type untreated ( ) seedlings, or seedlings exposed to NaCl, H  O , low temperature (cold shock), or wounded on their leaves or roots (wound). **C.** eIF2  phosphorylation in wild type seedlings, untreated ( ) or exposed to chlorsulfuron, salicylic acid, methyl jasmonate or 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). In addition, for methyl jasmonate, eIF2  phosphorylation was already detected after 30 minutes of induction (see Figure S4).

Figure 4: The TOR pathway does not interfere with AtGCN2 activity. Immunoblot analysis of eIF2  phosphorylation in TOR RNAi-silenced (35-7 and 65-1) or TOR-overexpressing (G166 and G548) lines (described in [25]). Seedlings of the different backgrounds were either left untreated ( ) or starved for branched amino acids using chlorsulfuron (Chlor) for 4h.

Figure 5: AtGCN2 is essential for growth in stress condition. Water (Top) or a solution containing chlorsulfuron (Bottom) were added to the medium containing either wild type (WT), *gcn2* mutant seedlings or *gcn2* mutant seedlings expressing an intact AtGCN2 gene (*gcn2:GCN2*). Treatments were applied on 10 days-old seedlings and pictures were taken 6 days after.

Figure 6. AtGCN2 is a regulator of general protein synthesis during amino acids and purine starvation. **A.** Absorbance profile at 254 nm of ribosomes purified by ultracentrifugation on a sucrose density gradient. The ribosomal pellet fraction was prepared from wild type (WT) or

gcn2 mutant seedlings starved for amino acid using chlorsulfuron for 2 or 4 hours. The positions of the monosomes (80S) and polysomes are indicated. **B.** 35S-labeled methionine incorporation of wild-type (WT) or *gcn2* mutant seedlings starved for purine using azA for 4 to 6 hours. A fraction of the total protein extract was separated on a SDS-polyacrylamide gel, desiccated and exposed to a phosphorimager screen (upper panel). An equal fraction of the total protein extract was stain with coomassie blue as a loading control (lower panel).

Description of additional data files

Figure S1. Evolutionary tree of the kinase domains of 138 *Arabidopsis* enzymes most closely related to GCN2, PKR, PERK and IIR1 eIF2 α kinases.

Figure S2. Multiple sequence alignment of the kinase domains of the eIF2 α kinase group on the evolutionary tree of Figure S1, performed using MUSCLE (v3.7).

Figure S3. Description of the *gcn2* mutant line.

Figure S4. Phosphorylation of eIF2 α in response to hormones

Figure S5. Absorbance profile at 254 nm of ribosomes purified by ultracentrifugation on a sucrose density gradient

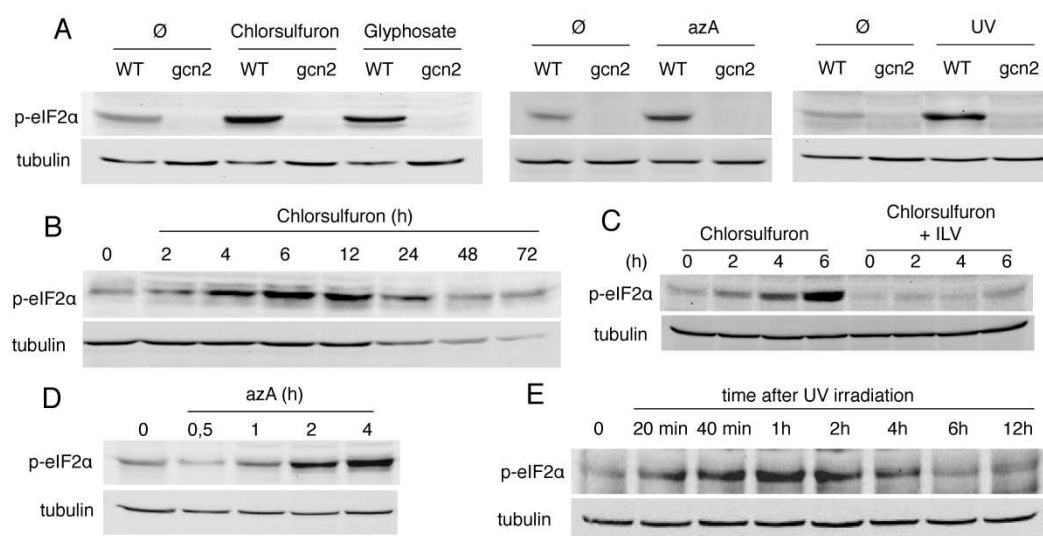


Figure 1

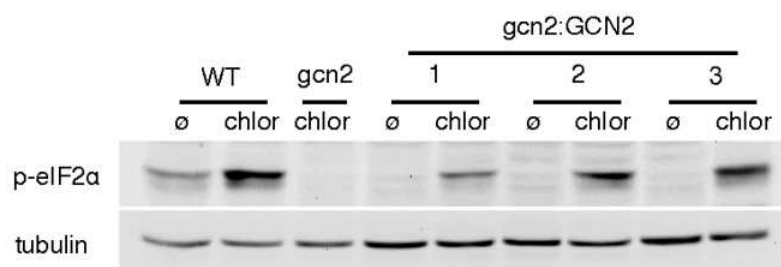


Figure 2

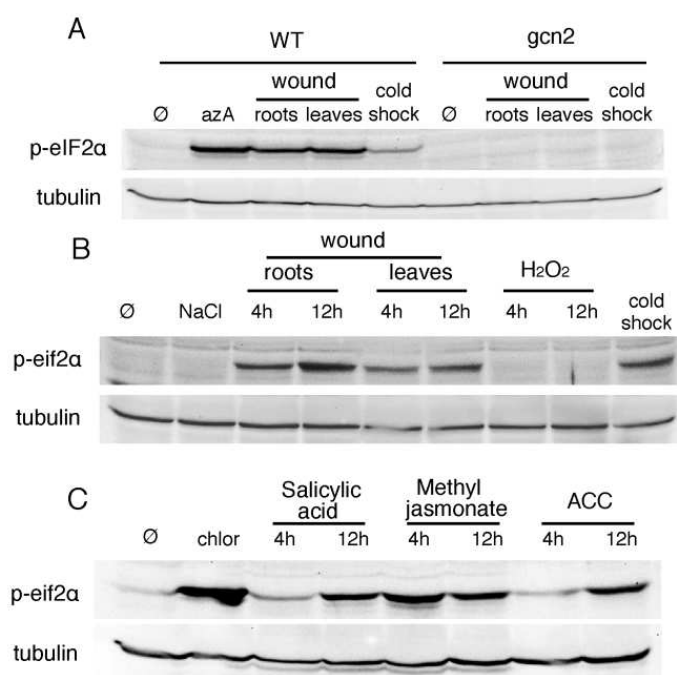


Figure 3

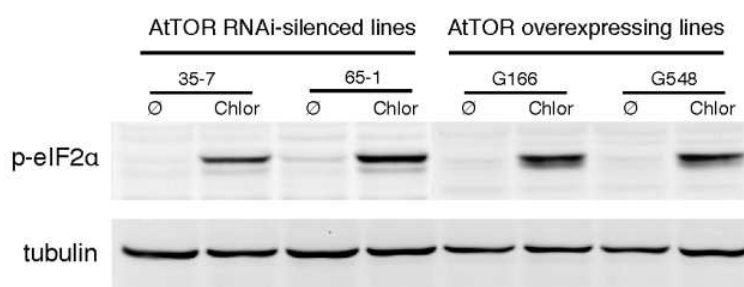


Figure 4

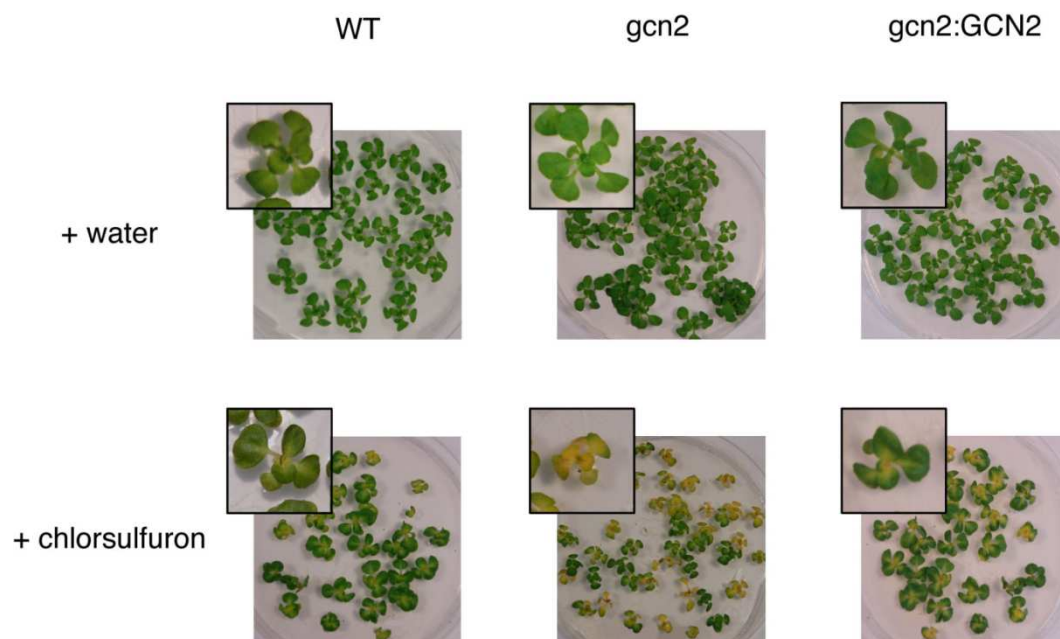


Figure 5

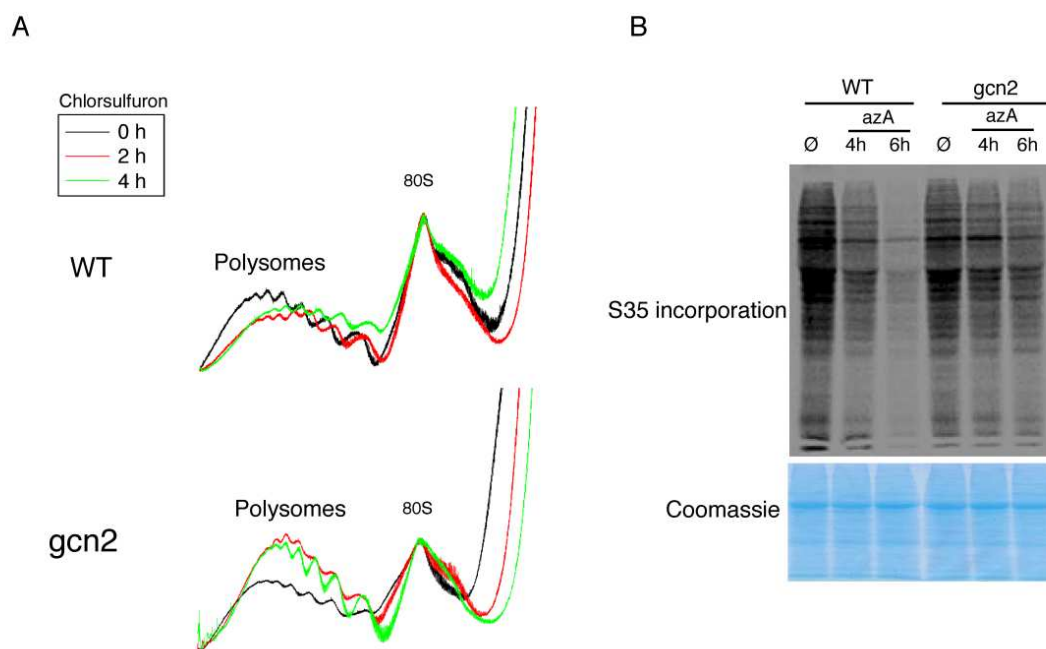
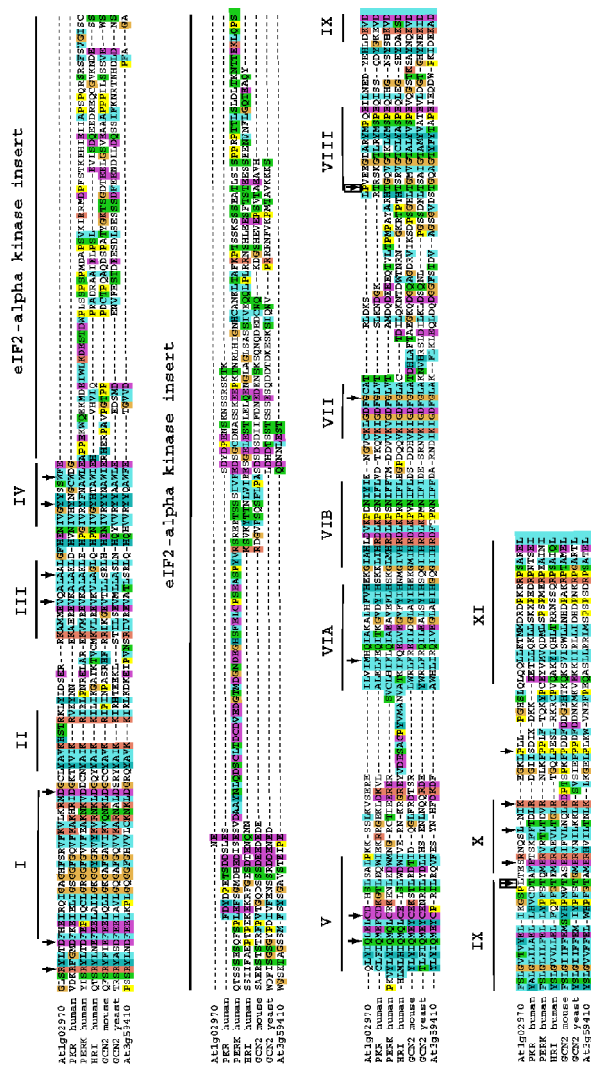


Figure 6



Figure S2



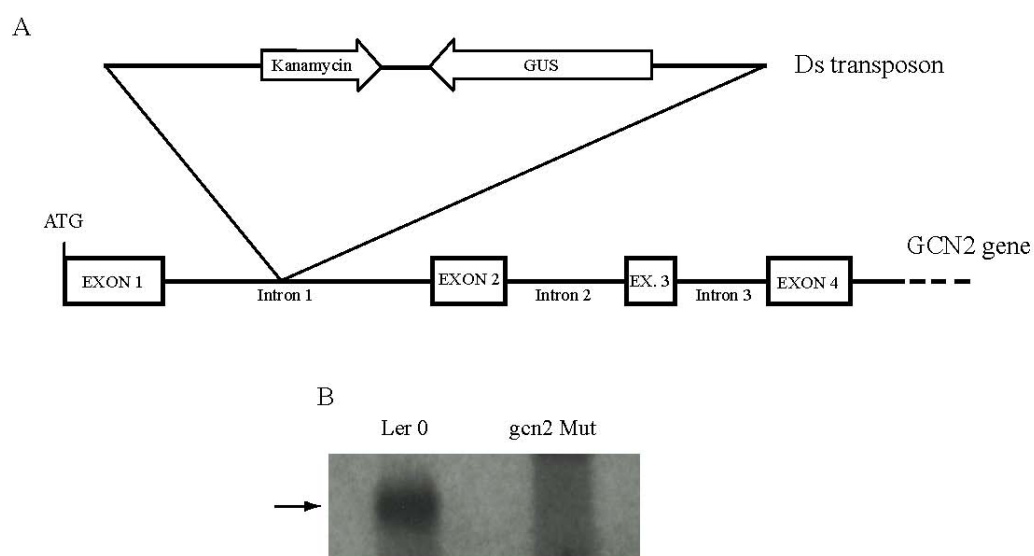


Figure S3

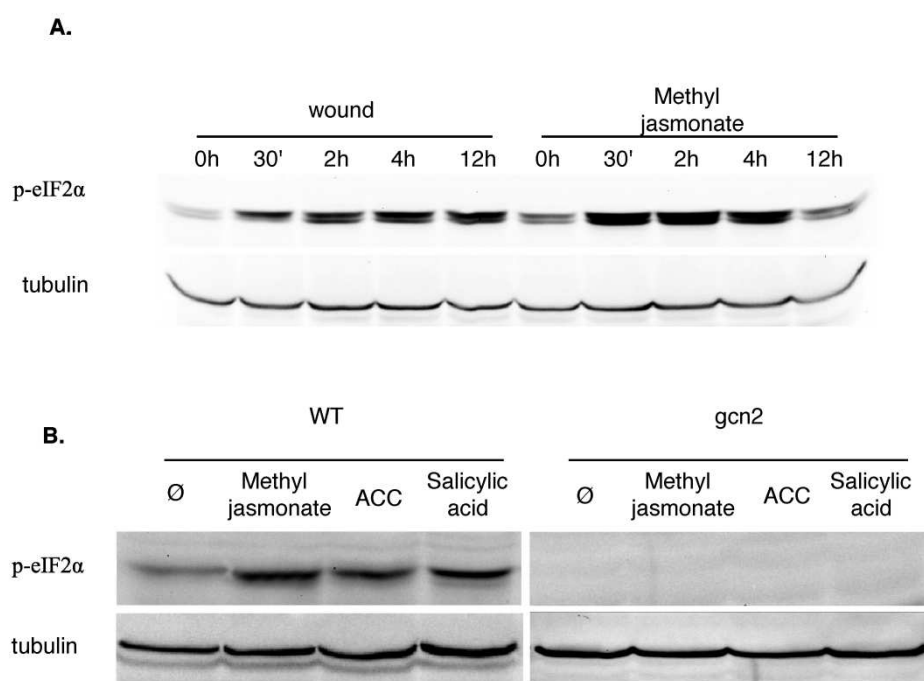


Figure S4

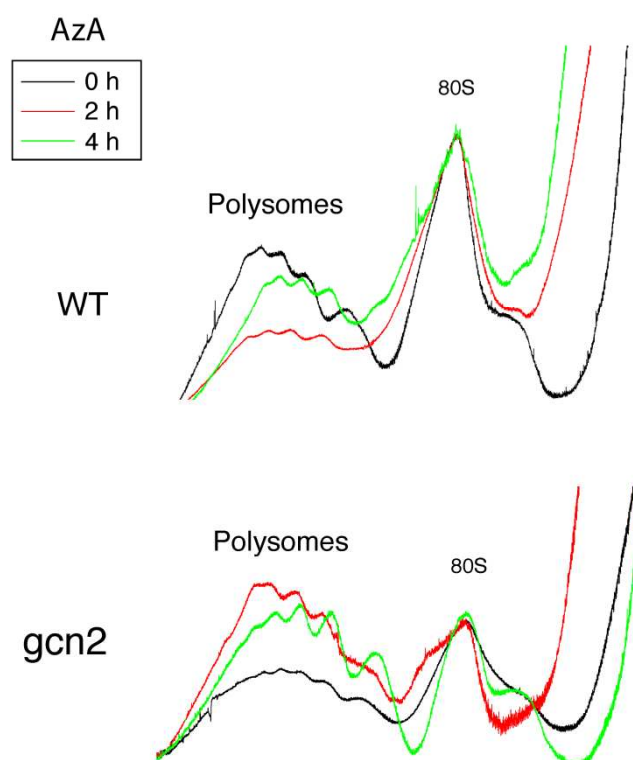


Figure S5

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary figures

Figure S1. Evolutionary tree of the kinase domains of 138 *Arabidopsis* enzymes most closely related to GCN2, PKR, PERK and HRI eIF2 α kinases. Kinase domains were aligned using the multiple sequence comparison by log-expectation (MUSCLE v3.7) software (Edgar, 2004) and the tree was reconstructed using the fast maximum likelihood tree estimation program PHYML (Guindon & Gascuel, 2003). Statistical support for the major clusters, obtained using the approximate likelihood-ratio test (aLRT) (Anisimova & Gascuel, 2006), are indicated. The position of the different eIF2 α kinases is shown.

Figure S2. Multiple sequence alignment of the kinase domains of the eIF2 α kinase group on the evolutionary tree of Figure S1, performed using MUSCLE (v3.7). Conserved protein kinase subdomains I through XI (Hanks & Hunter, 1995) are indicated above the sequences. Residues preferentially conserved among the eIF2 α kinase family (Dey et al, 2005) are shown by arrows. The eIF2 α -specific insert between subdomains IV and V (Hanks & Hunter, 1995) is indicated and the two positions known to be essential for eIF2 α kinase activity and substrate specificity (Dey et al, 2005) are indicated by boxed arrows.

Figure S3. Description of the *gcn2* mutant line. **A.** Schematic representation of the DS insertion in the At3g59410 (AtGCN2) locus. The structure of the AtGCN2 gene is shown, with coding (boxes) and noncoding (lines) regions. ATG represent the translation initiation site. The transposon is inserted in the gene first intron, 83 base pairs downstream of the end of the first exon. The transposon carries a gene conferring kanamycin resistance in opposite orientation to a gene encoding the GUS reporter gene. **B.** Northern-blot analysis using total RNA from a wild type (Ler 0) and *gcn2* mutant seedlings. The entire GCN2 cDNA was used as a probe. The expected transcript (see arrow) was detected only using RNA from wild type seedlings.

Figure S4. Phosphorylation of eIF2 α in response to hormones. **A.** Kinetic of eIF2 α phosphorylation after wounding leaves or in the presence of methyl jasmonate. Phosphorylation is strongly increase 30 minutes after exposure to methyl jasmonate. **B.** eIF2 α

phosphorylation in presence of salicylic acid, methyl jasmonate and ACC is completely dependent on the presence of a functional GCN2 enzyme.

Figure S5. Absorbance profile at 254 nm of ribosomes purified by ultracentrifugation on a sucrose density gradient. The ribosomal pellet fraction was prepared from wild type (WT) or *gcn2* mutant seedlings starved for purine using Aza for 2 or 4 hours. The positions of the monosomes (80S) and polysomes are indicated.

Supplementary methods

Complementation studies

To establish complemented plants for the *gcn2* mutation, the full-length *GCN2* cDNA was subcloned into a binary vector (35S promoter, hygromycin selection) and then introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain and used to transform mutant plants homozygous at the *gcn2* locus by the floral-dip method (Clough & Bent, 1998). Northern-blot analyses were used to distinguish complemented mutant plants expressing the intact form of GCN2.

Preparation of total protein extracts. Following exposure to stress, total protein extracts were prepared as following. For each treatment, three seedlings were ground in Laemmli buffer containing both Complete protease and PhosSTOP phosphatase inhibitor (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) and incubated at 95°C for 5 min. After centrifugation, samples were fractioned by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose.

Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* **55**(4): 539-552

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**(6): 735-743

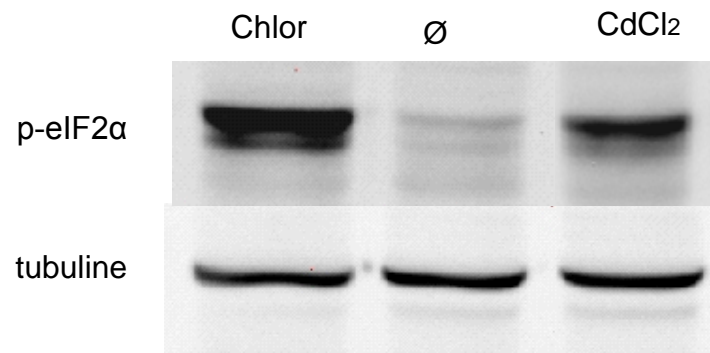
Dey M, Cao C, Dar AC, Tamura T, Ozato K, Sicheri F, Dever TE (2005) Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell* **122**(6): 901-913

Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**(5): 1792-1797

Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**(5): 696-704

Hanks SK, Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* **9**(8): 576-596

A



B

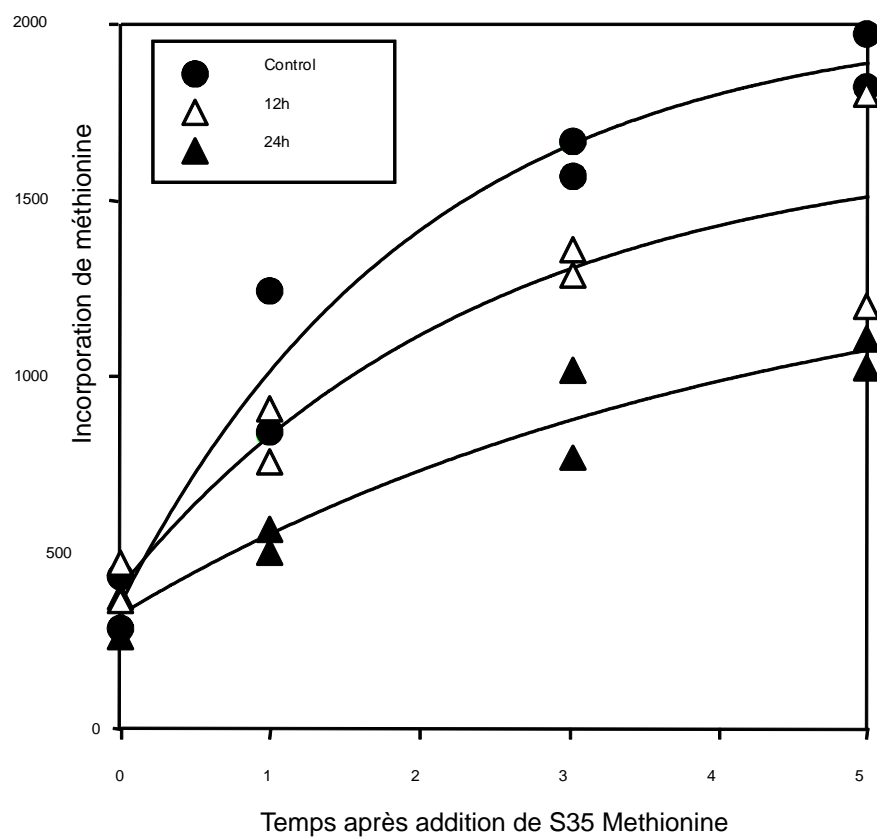


Figure 44 : Impact du cadmium sur la voie de contrôle de la traduction par eIF2α.

- A: Analyse par western blot du niveau de phosphorylation d'eIF2α dans des cellules d'arabidopsis non traitées (Ø), traitées avec un inhibiteur de la voie de biosynthèse en acides aminés (Chlor) ou du cadmium (CdCl2) pendant 24H.
- B: Cinétique d'incorporation de méthionine S35 dans des cellules sauvages préalablement traitées avec du cadmium pendant 24H.

II.2. Données supplémentaires.

II.2.1) Impact du cadmium sur la voie de contrôle de la traduction par eIF2 α .

Nous avons vu au cours de la synthèse bibliographique (cf. paragraphe II.1.2.g) que l'effet d'un métal lourd tel que le cadmium provoquait un stress oxydatif dans la cellule. Ainsi chez la levure, le cadmium active GCN2 par un mécanisme encore inconnu et cette activation conduit à la phosphorylation d'eIF2 α et donc à l'inhibition de la synthèse protéique. Nous avons donc voulu déterminer si dans le règne végétal, l'action des métaux lourds sur la voie de contrôle de GCN2 était conservée.

Pour cela, nous avons mis en contact des cellules d'*Arabidopsis* avec un sel de cadmium (CdCl₂) pendant 24H et nous avons observé le niveau de phosphorylation d'eIF2 α à la suite de ce stress. Le résultat est présenté sur la Figure 44A. Il apparaît clairement que dans des cellules traitées avec du cadmium, eIF2 α est fortement phosphorylée par comparaison au niveau de base présent dans les cellules non traitées. Dans cette expérience, l'ajout de Chlorsulfuron (Chlor), l'inhibiteur de la synthèse en acides aminés connu pour activer GCN2, constitue un contrôle positif.

En collaboration avec Rodnay Sormani de l'équipe de l'équipe Génomique fonctionnelle de recyclage de l'azote chez les plantes à l'INRA de Versailles, l'impact du cadmium sur la traduction a été testé dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 44B. Il apparaît que la cinétique d'incorporation de la méthionine S35 dans des cellules traitées au cadmium pendant 12H mais surtout 24H est fortement ralentie en comparaison avec des cellules non traitées. Cela indique que le cadmium conduit à un fort ralentissement de la synthèse protéique *de novo* dans les cellules d'*Arabidopsis*.

L'analyse de la phosphorylation d'eIF2 α et de la traduction dans des cellules traitées avec du cadmium semble donc indiquer que la voie de réponse à ce type de stress chez la plante passe bien par l'activation de GCN2 chez les plantes. Cela suggère que les plantes ont conservé ce mécanisme de défense contre le stress oxydatif présent chez la levure. Cependant, notre étude a aussi montré que le traitement par du H₂O₂ ne conduit pas à l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α (Figure 3 de la seconde publication) suggérant la présence de voies d'activation en parties différentes chez les plantes.

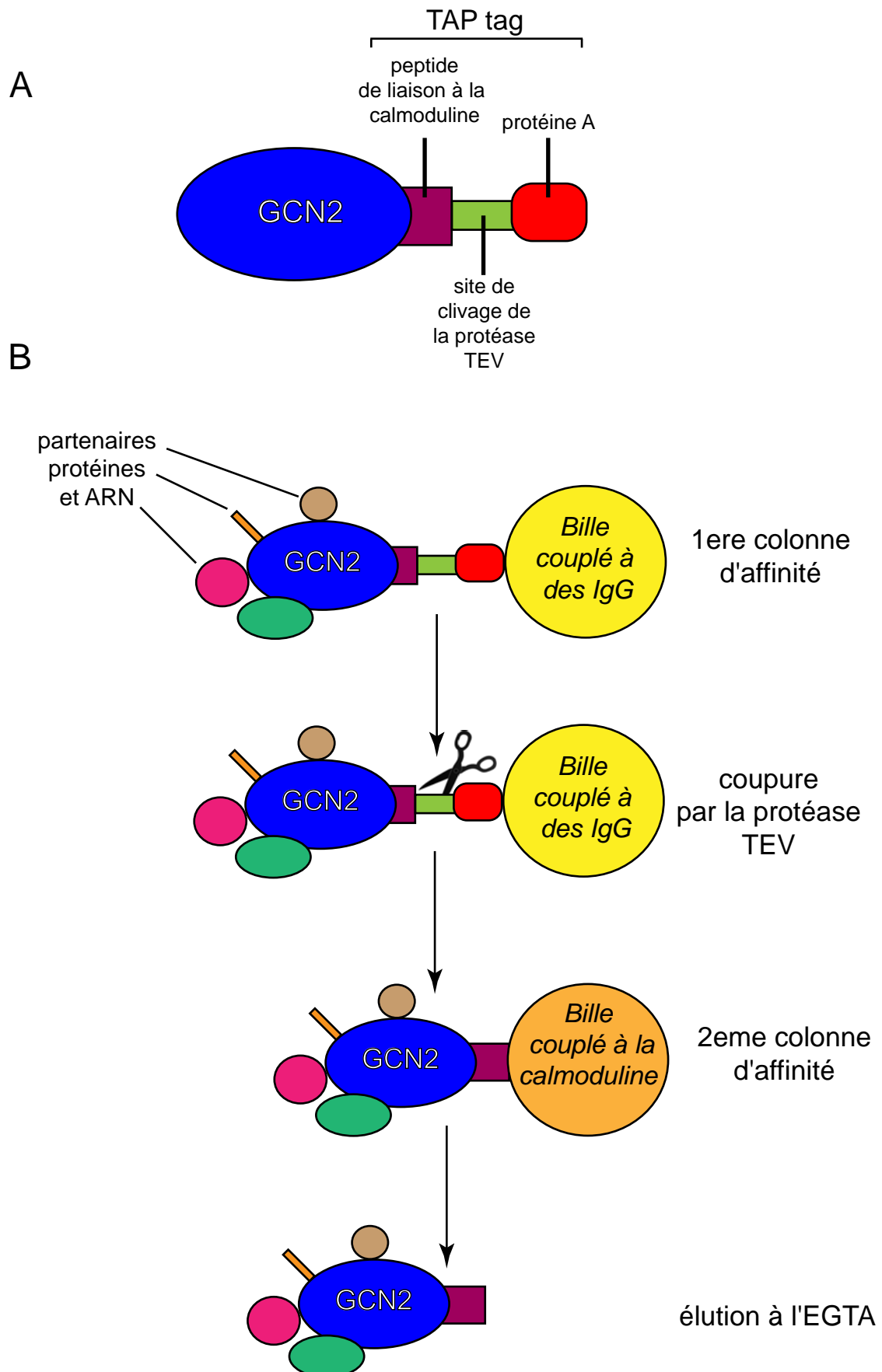


Figure 45: La purification TAP tag des partenaires de GCN2.

A: Structure du TAP tag associé à GCN2 en C terminal.

B: Les différentes étapes de la purification TAP tag.

II.2.2) Purification de GCN2 par la méthode du TAP tag et analyse de ses partenaires.

Le TAP (Tandem Affinity Purification) tag est une étiquette synthétique composée de trois parties distinctes (Figure 45A). On trouve d'abord des répétitions en tandem de la protéine A laquelle est capable d'être reconnue par des Immunoglobulines de type G (IgG). Ensuite on trouve le site de clivage de la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) et pour finir un domaine de liaison réversible à la calmoduline CBP (Calmodulin Binding Protein). Ce tag permet de purifier les partenaires protéiques et/ou ribonucléiques associés à la protéine étiquetée (Puig *et al.* 2001) (Rohila *et al.* 2004). Les différentes étapes de la purification de la protéine d'intérêt sont présentées dans la figure 45B. La première étape consiste à mettre en contact un extrait cellulaire natif de plantes exprimant la protéine fusionnée avec le TAP tag avec des billes couplées à des IgG. Cette première colonne d'affinité est basée sur la reconnaissance de la protéine A du tag par les IgG immobilisées sur les billes. Ainsi, après incubation et plusieurs étapes de rinçage, seule la protéine d'intérêt associée avec son complexe protéine/ARN est retenue dans la colonne. La seconde étape consiste à l'ajout de la TEV protéase laquelle va venir cliver son site TEV présent sur le tag et ainsi libérer le complexe protéique de son association avec les IgG. L'étape suivante est l'incubation de l'éluat précédemment obtenu avec une résine calmoduline qui est capable de s'associer avec la partie CBP du TAP tag. Après plusieurs étapes de lavage afin d'éliminer d'éventuels contaminants, l'élution du complexe se fait par ajout d'EDTA qui chélate le calcium nécessaire à la liaison entre la calmoduline et le tag CBP.

Pour déterminer les partenaires de la protéine GCN2 chez la plante, nous avons donc choisis d'étiqueter la protéine à l'aide de ce tag. Pour cela, des cellules dérivées d'une plante mutante pour *gcn2* ont été transformées avec un vecteur portant la protéine GCN2 fusionnée avec le TAP tag. Après une étape de sélection des cellules transformées, nous avons vérifié l'expression du transgène par Northern blot et western blot sein des lignées obtenues. Nous avons choisi d'utiliser une lignée exprimant le transcrit à un niveau relativement similaire au niveau évalué pour le transcrit endogène afin de rester le plus proche possible des conditions physiologiques (résultats non présentés). La Figure 46A montre le niveau de protéine présent

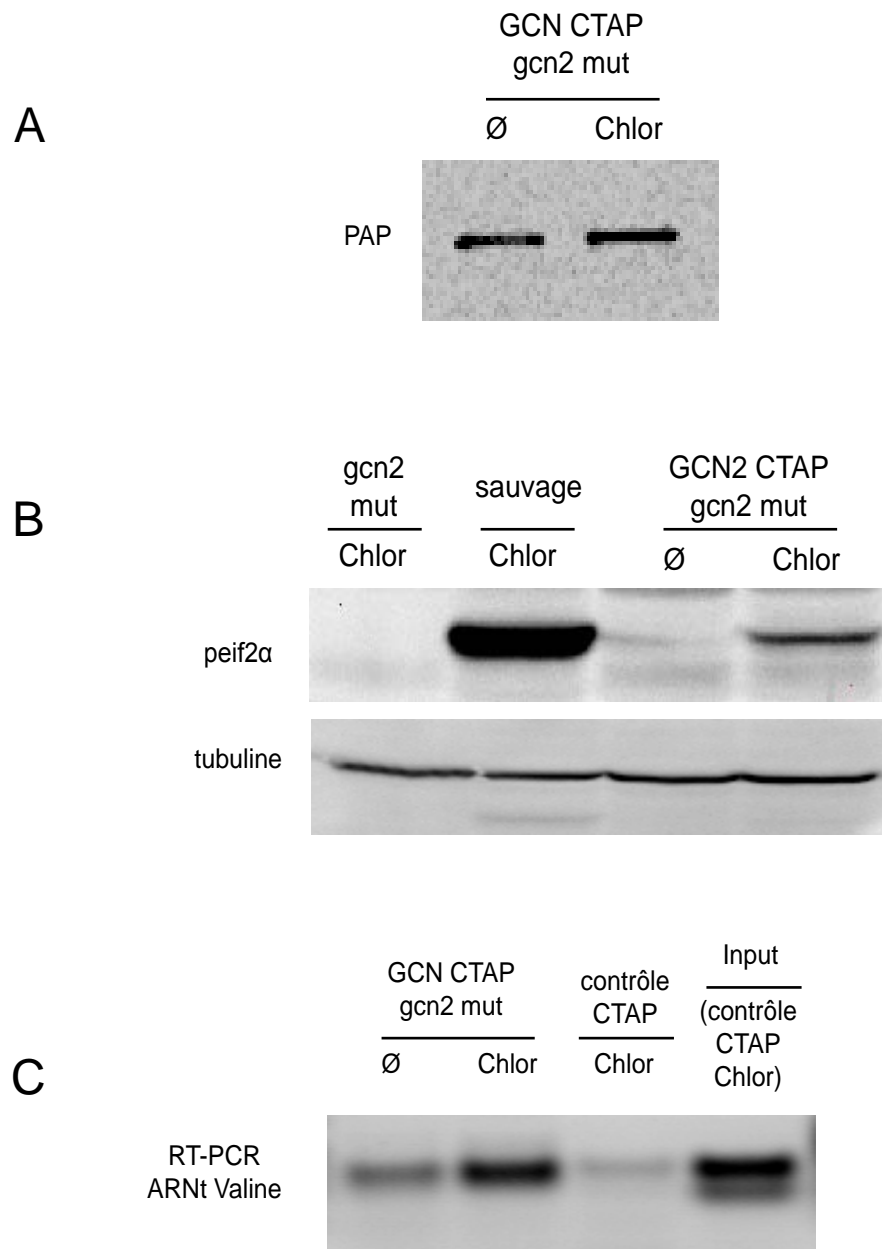


Figure 46: La liaison de GCN2 à l'ARNt.

A: Vérification de l'expression de la protéine GCN2-CTAP dans un contexte gcn2 mutant par western blot.

B: Complémentation de la protéine GCN2 CTAP pour la fonction kinase d'eIF2α.

C: Analyse par RT-PCR de la quantité d'ARNt valine co-purifié avec la protéine GCN2 CTAP.

dans la lignée de sélectionnée pour l'analyse grâce à l'utilisation de l'anticorps PAP, lequel reconnaît la protéine A du tag. L'ajout de chlorsulfuron, inducteur de l'activité kinase de GCN2, ne semble d'ailleurs pas provoquer de modifications de l'accumulation de la protéine comme le montre le résultat présenté.

Nous avons ensuite vérifié si la protéine fusionnée avec le TAP tag était toujours fonctionnelle. Pour cela, nous avons regardé si les cellules exprimant GCN2 étiquetée avec le TAP tag étaient capables de phosphoryler eIF2 α à la suite d'une carence en acides aminés. A l'origine, nous avons choisi d'étiqueter GCN2 à la fois du côté amino- et carboxy-terminal. Cependant, l'analyse de complémentation de la fonction kinase de GCN2 a montré que seule la protéine GCN2 étiquetée côté carboxy-terminal (GCN2-CTAP) était fonctionnelle. Le résultat de l'analyse par western blot de la lignée mutante pour *gcn2* exprimant GCN2-CTAP est présenté dans la Figure 46B et montre clairement une phosphorylation d'eIF2 α en réponse à la carence en acides aminés. Nous avons donc choisi d'utiliser cette lignée dans l'expérience de purification des complexes associés.

La première analyse réalisée grâce à cette purification TAP tag a été de déterminer si GCN2 était capable de lier des ARNt en condition de carences en acides aminées. Pour cela, nous avons traité la lignée de cellules *gcn2* mutante exprimant GCN2-CTAP avec le chlorsulfuron, molécule provoquant une carence en Isoleucine, Leucine et Valine. Nous avons également utilisé une lignée cellulaire contrôle exprimant le TAP tag seul. Cette lignée permet de vérifier si le tag n'est pas responsable d'une éventuelle association avec un ARN présent dans la cellule.

Ainsi, après purification, nous avons choisi de regarder par RT-PCR la présence de molécule d'ARNt Valine dans les éluats obtenus. Le résultat préliminaire de cette expérience est présenté dans la Figure 46C. On détecte un niveau de base d'ARNt Valine dans l'éluat contrôle (les cellules exprimant uniquement le tag). Ce niveau de base provient probablement de contaminations et des liaisons aspécifiques des ARNt valine avec les résines utilisées au cours de la purification. La technique de RT-PCR étant très sensible, il n'est donc pas anormal de mettre en évidence la présence de faibles quantités de cet ARN dans l'éluat contrôle. De plus, la purification de la protéine GCN2-CTAP semble indiquer un important enrichissement en ARNt valine avant mais surtout après traitement avec l'inhibiteur de la voie de synthèse des acides aminés branchés (Figure 46C). La dernière piste présentée sur la figure est le

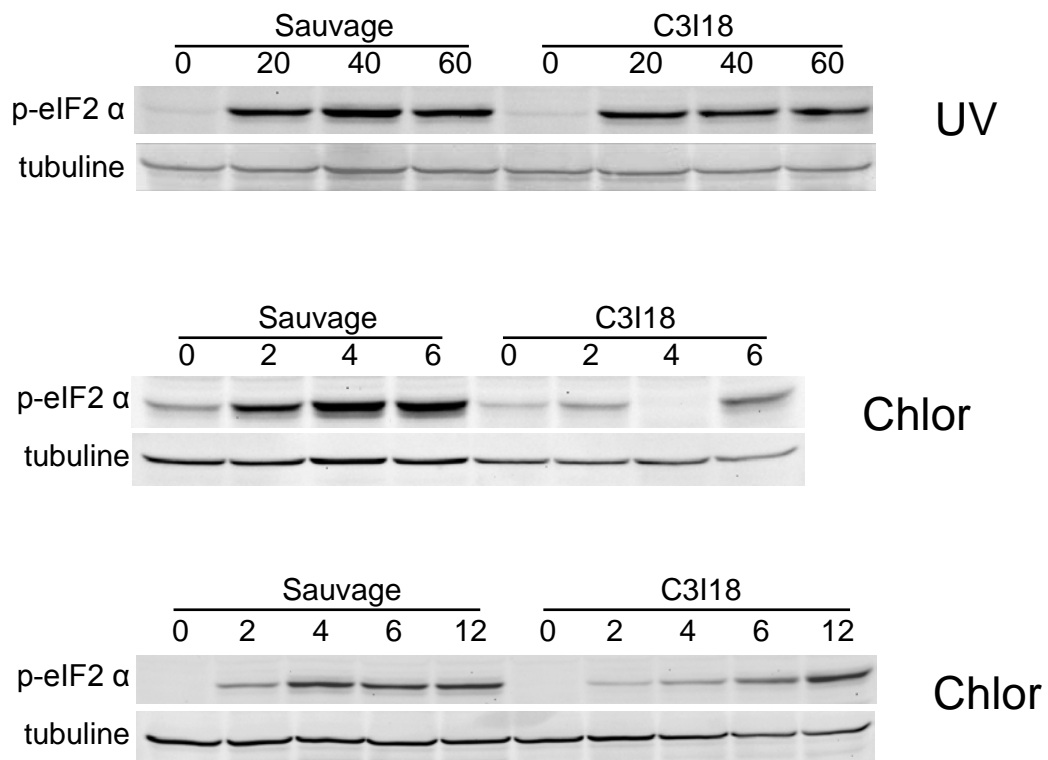


Figure 47 : Impact des SINE sur l'activité kinase de GCN2.

Analyse par western blot de la phosphorylation d'eIF2α en réponse au UV et à la carence en acides aminés (Chlor) dans un contexte sauvage et dans un contexte de surexpression d'un élément SINE (C3I18). La tubuline est utilisée comme contrôle interne.

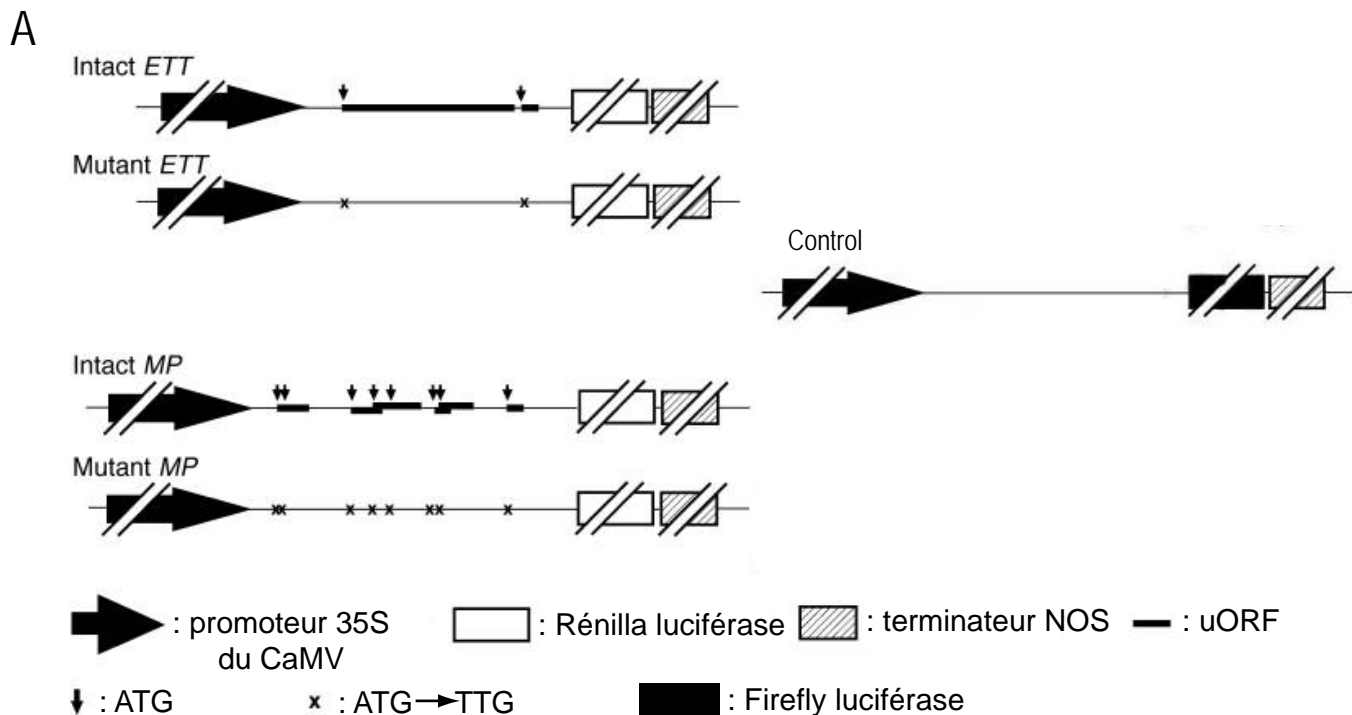
résultat d'une RT-PCR réalisée sur des ARN provenant d'un extrait total de la lignée *gcn2* mutante GCN2-CTAP ce qui constitue un contrôle positif.

Ce résultat préliminaire semble donc indiquer que comme son homologue levure, l'activation de GCN2 à la suite d'une carence en acides aminés passe également par la liaison de la kinase avec des molécules d'ARNt libres s'accumulant dans la cellule.

II.2.3) Impact de la surexpression d'un élément SINE sur l'activité kinase de GCN2.

Chez les mammifères, l'ARN de l'élément SINE Alu est capable d'interagir avec la protéine kinase PKR ce qui conduit à son inactivation (cf. paragraphe VII de la synthèse bibliographique). Ainsi, nous avons voulu déterminer si chez les plantes, la surexpression d'un élément SINE pouvait avoir des conséquences sur l'activité kinase de GCN2. Pour cela, nous avons choisi d'étudier la phosphorylation d'eIF2 α dans la lignée C3I18 surexprimant le SINE SB1 également utilisé dans l'étude sur le stress viral (cf. paragraphe I.2.1.c de la partie résultat). La Figure 47 présente la cinétique de phosphorylation d'eIF2 α à la suite d'une irradiation par des rayons UV dans des plantes sauvages et des plantes surexprimant le SINE SB1. Le résultat obtenu ne montre pas de différences importantes dans la cinétique de réponse indiquant que la présence du SINE ne semble pas influencer la fonction de GCN2 dans la réponse aux UV. Cependant, une différence semble apparaître dans la cinétique de la réponse à une carence en acides aminés. En effet le résultat de la Figure 47 montre que chez une plante sauvage, la phosphorylation d'eIF2 α atteint son niveau maximum entre 4 et 6H après le début du traitement. Par contre chez les plantes surexprimant le SINE SB1, la réponse semble être décalée dans le temps, le niveau de phosphorylation d'eIF2 α n'atteint son maximum que 12H après le début du traitement (Figure 47).

Les premières données concernant l'impact d'un élément SINE sur GCN2 semblent indiquer que comme pour la PKR, les SINE sont capables de moduler l'activité kinase de GCN2. En effet, au cours d'une carence en acides aminés, la présence de transcrits SINE semble retarder l'activation de GCN2 causée par l'accumulation d'ARNt libres. Cependant, il est également envisageable que l'effet même du chlorsulfuron soit retardé chez les plantes C3I18. En effet les plantes surexprimant le SINE SB1 présentent un phénotype marqué avec



B

		Intact <i>ETT</i>	contrôle
Ler	Ø	5000	8000
	Chlor	3000	3000
	UV	700	1200
Mutant <i>gcn2</i>	Ø	3000	3400
	Chlor	1300	200
	UV	360	400

		Intact <i>MP</i>	contrôle
Ler	Ø	40 000	7800
	Chlor	7300	1200
	UV	1700	3200
Mutant <i>gcn2</i>	Ø	28 000	8000
	Chlor	3700	830
	UV	500	200

Figure 48: Impact de la présence de uORF sur la traduction contrôlée par GCN2.

A: Représentation schématique des plasmides utilisés pour la transformation des protoplastes.

B: Dosage de l'activité luciférase des protoplastes transformés. Les unités sont exprimées en Unité Relative de Lumière (RLU).

notamment une diminution caractéristique de la longueur des racines, ce qui pourrait entraîner une absorption moins importante du chlorsulfuron.

II.2.4) Impact de la phosphorylation d'eIF2 α sur la réinitiation de la traduction.

La phosphorylation d'eIF2 α conduit à une diminution générale de la traduction mais également à la traduction de certains ARN spécifiques notamment ceux des facteurs GCN4 chez la levure et ATF4 chez les mammifères (cf. paragraphe II.7 de la synthèse bibliographique). Cette augmentation de traduction dans un contexte défavorable est possible grâce à la présence de cadres de lectures aussi appelés uORF en amont de l'ATG de ces facteurs.

Nous avons donc voulu voir l'impact de la présence de uORF au niveau de transcrits sur leur traduction chez les plantes lorsque GCN2 est activé. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de transformation transitoire de protoplastes avec des plasmides contenant un gène luciférase dont le niveau de traduction peut être mesuré facilement à l'aide d'un test biochimique. Les plasmides utilisés sont présentés dans la Figure 48A. Le premier provient de la région 5'UTR du gène ETTIN (ETT) et possède deux uORF successifs : un long de 279 nucléotides suivit d'un uORF plus court de seulement 18 nucléotides (Annexe 6). Le second plasmide utilisé provient du clonage de la région 5'UTR du gène MONOPTEROS (MP) et est constitué de 6 uORF d'une taille inférieure à 75 nucléotides (Annexe 6). Pour chacun de ces plasmides, nous avons également à notre disposition la version mutée pour les codons ATG des uORF (Figure 48A). Ces deux gènes ont été choisis car une étude a montré que les uORF présent au niveau de leurs 5'UTR régule négativement la traduction du cadre de lecture principal (Nishimura *et al.* 2005). Cela indique que la réinitiation de la traduction est une étape majeure dans la régulation de l'expression de ces protéines. L'étude de la régulation de la traduction de ces deux transcrits dans un contexte mutant pour la protéine GCN2 semble donc être un choix judicieux pour mettre en évidence un éventuel impact de la phosphorylation d'eIF2 α sur la réinitiation de la traduction.

Pour vérifier l'efficacité de transformation, nous avons réalisé des co-transformation de chacun de ces plasmides avec un plasmide exprimant un second type de luciférase qui

permet ainsi une mesure séquentielle de l'expression du plasmide test et du plasmide de référence (Figure 48A).

Après co-transformation des protoplastes, nous les avons placés dans des conditions pour lesquelles la phosphorylation d'eIF2 α était induite dans des cellules. Ainsi, les protoplastes ont été mis en contact avec du chlorsulfuron pendant 6h ou ont été irradiés par des UV. Les résultats des dosages de l'activité luciférase de chacun des plasmides sont indiqués dans le tableau présenté dans la Figure 48B et correspondent à la moyenne de 6 expériences indépendantes. Il apparaît que le traitement UV ou l'ajout de l'inhibiteur de la synthèse d'acides aminés provoque une diminution de la traduction des vecteurs ETT et MP que ce soit en contexte sauvage ou en contexte mutant pour la protéine GCN2. Il est intéressant de noter que cette diminution de traduction semble également affecter la traduction du vecteur contrôle ce qui rend difficile la comparaison des données obtenues. Cependant, il apparaît que pour chacun des plasmides, le niveau de traduction de la luciférase est toujours plus important dans un contexte sauvage que dans un contexte mutant. Enfin, les tests réalisés sur les plasmides mutés au niveau des uORF montrent une augmentation de la traduction de la luciférase dans un contexte sauvage mais aussi mutant (résultats non présentés). Cela confirme que chez les plantes, ces uORF ont un effet répresseur pour la traduction des gènes placés en aval (Nishimura *et al.* 2005).

Les résultats préliminaires présentés ici ne permettent pas de conclure sur un éventuel impact de la voie GCN2 sur la traduction de transcrits porteur d'uORF en amont de leurs séquences codantes. Ceci est principalement dû à l'absence d'un contrôle interne permettant de normaliser les données obtenues. Ainsi, même si la phosphorylation d'eIF2 α conduit à une diminution de l'efficacité de réinitiation de la traduction, notre approche expérimentale ne nous permet pas de mettre en évidence un tel phénomène.

II.2.5) Etude de la conservation de la voie de réponse générale des gènes de biosynthèse en réponse à la phosphorylation d'eIF2 α .

Chez la levure et chez les mammifères, à la suite d'une carence en un seul acide aminé, l'activation de la traduction des facteurs GCN4 et ATF4 conduit à l'augmentation de la transcription de nombreux gènes, en particulier des gènes intervenant dans la voie de

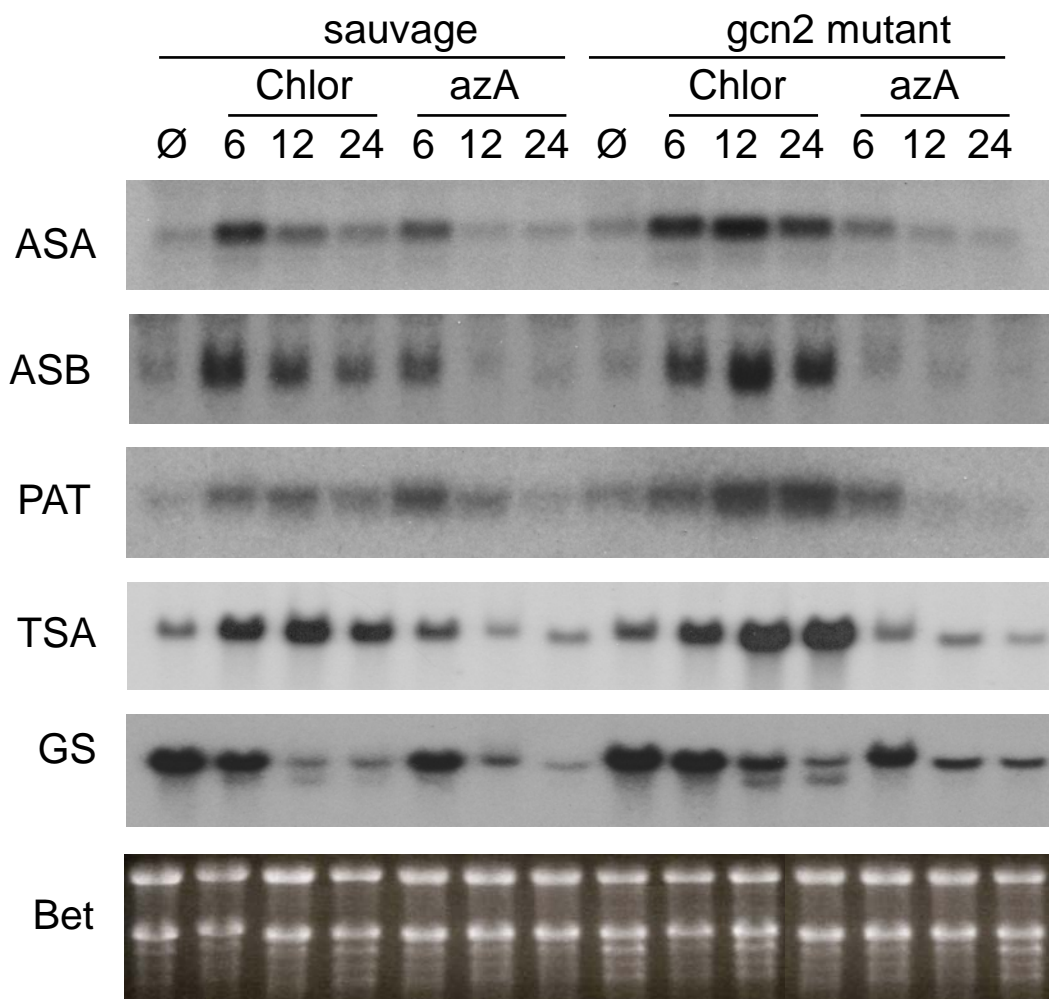


Figure 49: Impact du mutant *gcn2* sur la transcription des gènes de biosynthèse des acides aminés.

Impact de la carence en acides aminés (Chlor) et de la carence en purine (azA) sur la transcription de gènes intervenant dans la biosynthèse des acides aminés (ASA, ASB1, PAT, TSA) et dans l'assimilation des nitrates (GS).

biosynthèse de l'ensemble des acides aminés (cf. paragraphe II.7 de la synthèse bibliographique). Or chez *Arabidopsis*, cette réponse générale semble être conservée car une étude a montré que l'inhibition de la synthèse d'un acide aminé branché conduit à l'augmentation de la transcription de gènes intervenant dans la synthèse des acides aminés aromatiques (Zhao, Williams and Last 1998; Guyer, Patton and Ward 1995). Pour voir si cette voie de réponse générale passe également par l'activation de la kinase d'eIF2 α chez les plantes, nous avons choisi de suivre l'accumulation des transcrits analysés au cours de ces deux études à la suite d'un traitement par le chlorsulfuron (Chlor) ou l'aza-Adénine (Aza), lesquels provoquent la phosphorylation d'eIF2 α chez les plantes. Nous avons donc étudié des gènes codant pour des enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse du tryptophane : l'Anthranilate Synthase Alpha (ASA), l'Anthranilate Synthase Beta (ASB), la Phosphoribosyl Anthranilate Transferase (PAT) et la Tryptophane Synthase Alpha (TSA). Nous avons également suivi l'activité du gène codant pour la Glutamine Synthétase chloroplastique (GS) qui est la première enzyme permettant l'assimilation de l'azote inorganique (NH $_4^+$) au sein du glutamate.

L'analyse a été effectuée sur des plantules sauvages et mutantes pour GCN2 mises en contact pendant 6 à 12 H avec l'agent inducteur. Le résultat de l'hybridation des transcrits avec les sondes choisies est présenté dans la Figure 49A. Chez les plantes sauvages, l'inhibition de la synthèse des acides aminés branchés provoque l'activation de l'expression des gènes codant pour les enzymes intervenant dans la synthèse du tryptophane (ASA, ASB, PAT et TSA). Ce résultat confirme les observations faites dans les études précédemment cités. D'autre part, il apparaît que la carence en purine conduit également à l'activation de ces gènes selon une cinétique plus rapide car l'effet apparaît dès 6H de traitement par l'aza-adénine avec un retour à la normal 12H après le début du traitement. L'activation de ces gènes à la suite d'une carence en acides aminés ou en purine est un phénomène transitoire. Comme attendu, le gène codant pour la GS voit l'accumulation de son transcrit fortement diminuer après une carence en acides aminés. Le même résultat est obtenu après une carence en purines (Figure 49A) et (Zhao, Williams and Last 1998).

La même expérience effectuée sur le mutant GCN2 donne des résultats globalement similaires à ceux obtenues chez la plante sauvage (Figure 49A). En effet, après une carence en purine ou en acides aminés, les gènes codant les enzymes intervenant dans la biosynthèse des acides aminés semblent être activés ou réprimés de la même manière, indépendamment de

l'état de phosphorylation d'eIF2 α . Ainsi, il apparaît que pour les gènes observés dans cette analyse, la phosphorylation d'eIF2 α ne semble pas être la voie utilisée dans la mise en place d'une réponse globale à la suite d'une carence en acides aminés.

II.2.6) Recherche d'éventuels gènes cibles de facteurs bZIP contrôlés par la phosphorylation d'eIF2 α .

Afin de mettre en évidence d'éventuels gènes cibles de facteurs bZIP intervenant dans la voie de réponse dépendante de GCN2, nous avons choisi de suivre l'accumulation de certains transcrits en réponse à des stress. Les deux stress utilisés sont la carence en acides aminés *via* l'utilisation du chlorsulfuron et l'irradiation UV, dont on sait qu'ils provoquent la phosphorylation d'eIF2 α chez les plantes traitées. L'extraction d'ARN a été réalisée après 24H ou 48H d'action de l'inhibiteur de la voie de biosynthèse des acides aminés. Pour les UV, nous avons choisi d'irradier les plantes une fois et l'extraction a été réalisée 12H après (UV 12H), ou nous avons renouvelé l'opération une seconde fois avant de faire l'extraction (UV 12H X2). Nous avons réalisé l'analyse dans un contexte sauvage ou mutant pour GCN2. Les transcrits étudiés codent pour la glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase (G6P), la Chalcone Synthase (ChS), la Protéine Phosphatase 2A (PP2A), une Transférase des acides aminés Branchés (BaaT), la Proline Deshydrogénase (ProDH), l'Histidinol Deshydrogénase (HDH) et la Lipoxygénase 2 (LOX).

Nous avons choisi le gène codant pour la glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase car il code pour une enzyme intervenant dans l'hydrolyse du sucrose et possède parallèlement un site conservé de fixation des facteurs bZIP au niveau de son promoteur.

De manière similaire, la Baat est une enzyme qui intervient dans la biosynthèse des acides aminés branchés et dont le promoteur du gène possède un site de fixation potentiel aux facteurs bZIP.

Le gène codant pour la chalcone synthase est lui connu pour être régulé par les UV *via* la fixation d'un facteur bZIP au niveau de son promoteur (Safrany *et al.* 2008).

La protéine phosphatase 2 d'*Arabidopsis*, comme son homologue levure, est quant à elle capable d'interagir avec la protéine TAP42 (Harris *et al.* 1999). Or chez la levure, le couple PP2A/TAP42 est responsable de la déphosphorylation d'eIF2 α .

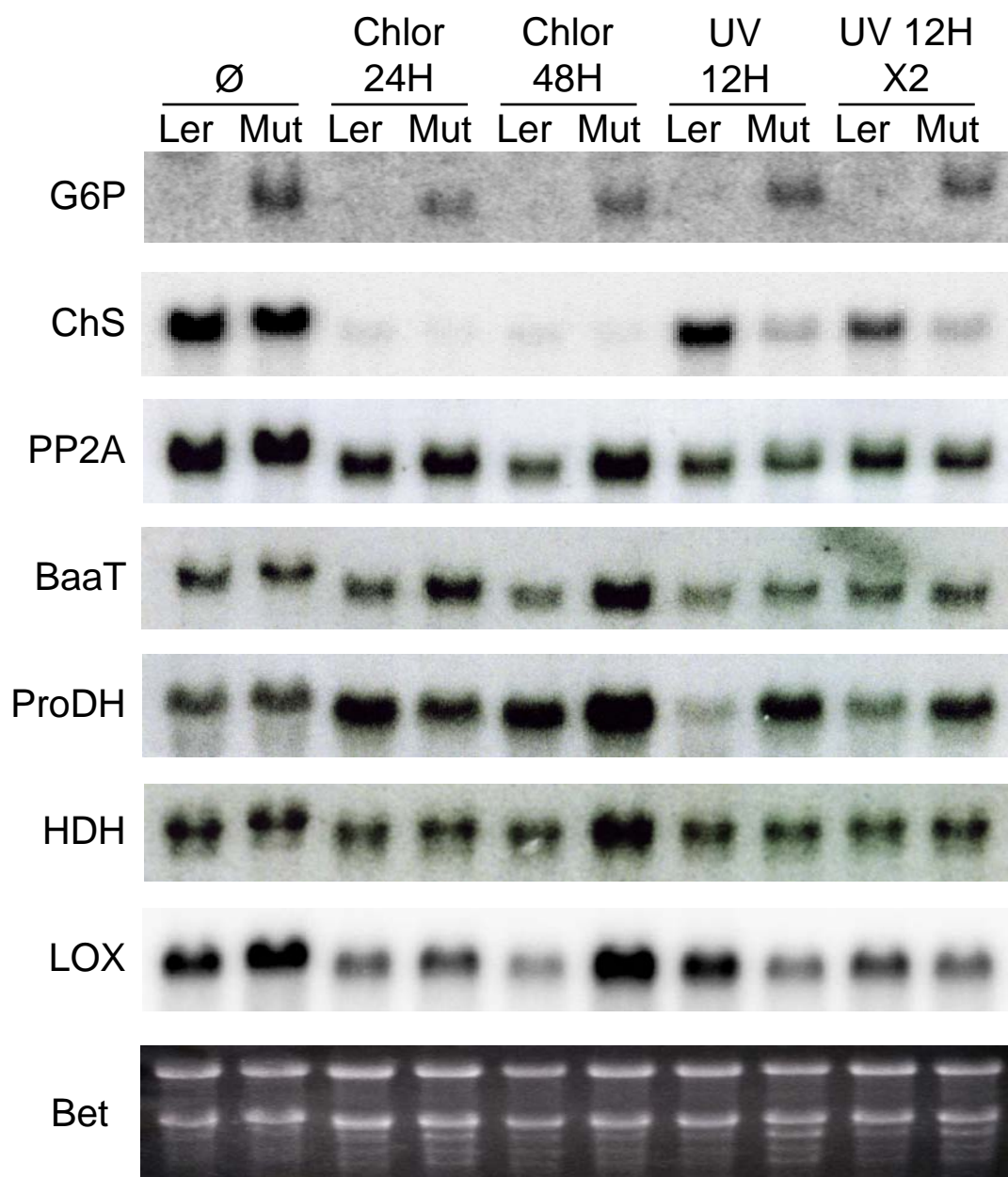


Figure 50: Impact du mutant *gcn2* sur la transcription des gènes cibles de facteurs bZIP.

Impact de la carence en acides aminés (Chlor) et de l'irradiation UV sur l'accumulation de gènes cibles des facteurs bZIP.

Le gène codant pour la proline deshydrogénase voit son expression varier en réponse à de nombreux stress. Cette régulation passe par la présence de site de liaison des facteurs bZIP du groupe S, facteurs qui possèdent des uORF au niveau de leurs 5'UTR (Sato, Fujita, Nakashima, Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2004).

Le gène codant pour l'HDH présente une forte homologie avec le gène His4 de levure dont l'expression est régulée par le facteur bZIP GCN4. Chez *Arabidopsis*, l'expression du gène HDH est induite à la suite d'irradiation par les UV (Zimmermann *et al.* 1999).

Enfin, le gène codant pour la lipoxygénase 2, une enzyme intervenant dans la biosynthèse de l'acide jasmonique, possède un motif de liaison aux facteurs bZIP au niveau de son promoteur. Chez les plantes, l'expression de ce gène est d'ailleurs stimulée lors d'infection par des insectes herbivores (Zheng *et al.* 2007).

Les résultats obtenus à la suite des hybridations Northern sont présentés dans la Figure 50. Globalement, l'effet du chlorsulfuron ou des UV ne conduit pas à une différence d'expression entre les plantes sauvages et les plantes mutantes pour les gènes PP2A, BaaT, ProDH, HDH et LOX. Ainsi, même si quelques différences apparaissent selon les conditions expérimentales, il ne semble pas que l'expression de ces gènes soit régulée par GCN2.

En ce qui concerne l'étude du gène G6P, seules les plantes mutantes GCN2 semblent exprimer le transcrit correspondant. Cela semble indiquer que ce gène est déréprimé quand la kinase est absente.

Pour le gène codant pour la chalcone synthase, la carence en acides aminés semble induire une forte diminution de l'accumulation du transcrit dans un contexte mutant et sauvage. L'irradiation par les UV semble elle diminuer la quantité de transcrit uniquement dans les plantes mutantes pour GCN2. Cependant, même si un différentiel est observé dans le cas présent, il ne s'agit que d'un résultat préliminaire. D'autre part, il ne reflète pas une différence en réponse à la phosphorylation d'eIF2 α puisqu'il n'est pas présent pour le chlorsulfuron et passe donc par un mécanisme à identifier.

A ce jour aucune étude n'a pu mettre en évidence un facteur de transcription positivement régulé à la suite de la phosphorylation d'eIF2 α . D'ailleurs aucun gène cible potentiel ne semble se dégager de notre analyse.

Discussion

I. Régulation de la transcription des éléments SINE.

Différents travaux chez les mammifères ont montré une réponse spécifique des SINE suite à une infection virale, suggérant un rôle pour ces éléments dans la réponse au stress (Schmid 1998). Dans ce travail, nous avons voulu étudier l'impact d'un stress viral chez les plantes. Pour cela, des plantes d'*Arabidopsis thaliana* ont été infectées par le virus FBNYV et l'impact de cette infection sur la transcription des SINE et plus généralement sur la transcription pol III a été étudiée. En effet la souche virale utilisée code pour une protéine CLINK potentiellement capable d'inactiver la protéine RB, un régulateur clef du cycle cellulaire. Pour évaluer l'importance de cette protéine dans le stress viral nous avons utilisé des lignées transgéniques pour la protéine CLINK et analysé la transcription des gènes pol III et des éléments SINE après induction de cette protéine.

I.1. Impact du stress viral et de la protéine CLINK sur la transcription pol III.

L'étude de la transcription générale pol III a été réalisée avec les gènes 7SL, U3, ARNt phénylalanine et 5S qui possèdent différents types de promoteur pol III. Le gène 5S a un promoteur de type I, l'ARNt ainsi que la plupart des SINE un promoteur de type II 7SL et U3 un promoteur de type III. Ces différents types de promoteurs sont régulés par des éléments cis et trans spécifiques (Geiduschek and Kassavetis 2001).

Un crible PCR sur l'ADN des différentes plantes mises en contact avec des insectes porteurs du virus a permis d'identifier des plantes présentant différents niveaux d'infections. Cependant l'étude de l'évolution des différents transcrits pol III (7SL, U3, ARNt et 5S) par Northern blot n'a pas permis de mettre en évidence de variation supérieure à un facteur 2 entre les plantes criblées positives à l'infection et les plantes mises en contact avec des insectes sains. Même si notre crible PCR a permis de mettre en évidence la présence de l'ADN viral au sein des tissus aériens de la plupart des plantes mises en contact avec l'insecte porteur du virus, la méthode d'infection ne permet en aucun cas de déterminer le stade d'infection du tissu étudié. En effet au cours de l'infection systémique, le virus s'est propagé

progressivement dans l'ensemble de la plante. Ainsi, certains tissus au sein des plantes récoltées correspondent à des zones où l'infection est déjà établie depuis un certain temps, d'autres tissus ne sont qu'à un stade précoce de l'infection. Un impact sur la transcription pol III à un stade précis de l'infection pourrait alors être difficilement détectable. On peut d'ailleurs noter que la protéine CLINK du nanovirus est exprimée dans les phases précoces de l'infection cellulaire.

Parallèlement, l'expression de la protéine CLINK a été stimulée par incubation des feuilles de nos plantes transgéniques dans une solution de dexaméthasone. Un signal correspondant à la présence du transcrit Clink a été détecté dans cette expérience dès 2 heures de stimulation indiquant que la protéine CLINK est probablement présente dans les tissus stimulés (figure 42).

L'évolution des mêmes transcrits pol III a également été analysée par Northern blot dans les plantes exprimant la protéine CLINK, mais comme pour les plantes infectées aucune variation supérieure à un facteur 2 n'a été mise en évidence. Dans ces deux approches expérimentales, la transcription pol III dans son ensemble ne semble donc pas être modifiée de manière importante. On peut cependant noter que les gènes pol III étudiés sont très fortement exprimés chez les plantes ; même si la protéine CLINK ou l'infection virale est capable d'augmenter la disponibilité des facteurs nécessaires à la transcription pol III, le niveau basal de l'expression de ces gènes est tellement important qu'une induction supplémentaire de leur expression, qui serait relativement limitée mais reproductible, pourrait ne pas être facilement détectable par les outils à notre disposition. Cependant, chez les animaux, l'inhibition de RB a un impact détectable sur les populations à l'équilibre d'ARN pol I et pol III (White *et al.* 1996; Cavanaugh *et al.* 1995). Il est aussi envisageable que l'absence de différence sur la quantité d'ARN détectée chez la plante puisse être le résultat d'une régulation post-transcriptionnelle qui ne permet pas une suraccumulation.

1.1.1) Impact du stress viral sur l'expression des SINE.

Il semblerait que certains stress puissent induire une activation spécifique des SINE sans toutefois modifier la transcription des autres gènes pol III (Schmid 1998). Pour tester cela, nous avons analysé l'impact de l'infection virale sur le SINE SB1 présent dans nos plantes infectées par le virus FBNYV. Cette étude réalisée par Northern blot montre que le niveau d'accumulation des transcrits du SINE transgénique SB1 entre les plantes contrôles et les plantes infectées reste similaire (augmentation maximum de l'ordre de 2 fois ; Figure 40). Le stress viral semble donc n'avoir que peu ou pas d'impact sur l'expression de cet élément dans nos conditions expérimentales. Dans cette étude du SINE transgénique SB1, il faut noter que cet élément n'est présent qu'à l'état d'une copie homozygote dans la lignée de plantes utilisées. Cet élément se trouve relativement bien exprimé chez les plantes contrôles non-infectées suggérant qu'il n'est pas soumis au niveau de répression important touchant les éléments SINE endogènes. Il est envisageable que le stress viral ne puisse induire qu'une dérépression des loci SINE. L'absence d'effet sur SB1 pourrait n'être dû qu'à son caractère exogène échappant ainsi à la forte répression naturelle que subissent les éléments SINE.

Dans cette optique, une étude de variation de la transcription de SINE endogènes d'*Arabidopsis thaliana* suite à l'infection virale ou l'expression de CLINK a été réalisée par une approche de RT-PCR quantitative. Deux loci SINE de chaque famille SB2, SB3 et SB4 ont été testés. Pour les loci SINE possédant un faible niveau d'expression basale aucune augmentation significative de leur niveau de transcrits n'a été observée. Aucune dérépression n'a également été observée pour les loci fortement réprimés et non transcrits en conditions normales.

(Li and Schmid 2001) ont montré qu'une infection virale pouvait conduire à une activation spécifique touchant seulement un certain nombre de loci du SINE Alu. Or, notre approche RT-PCR a été réalisée sur seulement 6 des 266 loci SINE d'*Arabidopsis thaliana*.

Pour détecter les transcrits SINE nous avons utilisé une amorce située dans la partie 3' flanquante spécifique de chacun des loci SINE (Figure 41). Cela permet uniquement la mise en évidence de la forme pleine longueur de ces éléments. Une variation dans l'accumulation des formes tronquées poly(A) et sc n'est pas détectable avec ces expériences de RT-PCR et l'on ne peut exclure que le stress induise uniquement une modification de l'accumulation

d'une forme particulière. Des expériences de " primer extension " devraient donc être mise au point en utilisant une amorce dans la partie SINE du transcrit et permettant de suivre dans sa globalité la transcription des familles de SINE suite au stress. Enfin, il serait raisonnable de tester l'impact d'autres types de stress (chocs thermiques, cycloheximide...) sur l'expression des SINE en raison des problèmes potentiels (voir paragraphe précédent) inhérent aux approches expérimentales que nous avons utilisées.

1.1.2) La protéine CLINK et la fonction de RB dans la cellule végétale.

L'absence d'impact de l'expression de CLINK sur la transcription pol III nous a conduit à vérifier si la protéine virale était capable d'interagir avec RB *in vivo* dans la cellule. Notre méthode a consisté à étudier l'impact de l'expression de la protéine CLINK sur les gènes contrôlés par les facteurs E2F. En effet une des fonctions de la protéine RB est de contrôler l'expression de gènes clefs du cycle cellulaire (Harbour and Dean 2000). Pour cela, il interagit avec les facteurs E2F, facteurs régulant la transcription des gènes responsables de l'entrée dans le cycle cellulaire (phases G1/S) comme certaines cyclines et certaines kinases CDK mais également des protéines intervenant dans le processus de réplication de l'ADN. Ainsi, si la protéine CLINK est capable de se lier à RB comme c'est le cas avec d'autre protéine virale (comme E1A chez les mammifères), on s'attend à une dérepression des gènes contrôlés par les facteurs E2F. C'est en effet le résultat que l'on a obtenu au cours de notre analyse (cf. Figure 1 publication n°1) car l'expression des gènes PCNA, CDC6 est déreprimée après expression de CLINK dans des cellules différenciées. Cependant, il apparaît que non seulement des gènes spécifiques des phases G1/S mais aussi des gènes spécifiques des phases G2/M sont également dérégulés (Figure 1 publication n°1). Cela semble indiquer que l'inhibition de RB par la protéine CLINK est réelle dans la cellule et ne conduit pas seulement à l'activation de certains gènes nécessaires à la réplication du virus, mais semble aussi réactiver le cycle cellulaire dans son ensemble. Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par l'observation de noyau en phase de mitose (Figure 2 publication n°1).

Dans le monde végétal, des proliférations excessives assimilables à un processus de tumorigénèse n'ont jamais été observées. D'ailleurs, l'expression en continue de la protéine CLINK au cours du développement n'induit pas de phénotypes morphologiques particuliers.

Cependant, il apparaît que le nombre de cellules épithéliales est clairement plus important que chez une plante sauvage (Figure 3, publication n°1). Une hypothèse est que chez ces plantes, le blocage des gènes E2F mis en place par RB est retardé par son inhibition par la protéine CLINK ce qui conduit à des divisions supplémentaires. Ce processus de division est ensuite limité par la surface même de l'organe. En effet, contrairement aux cellules de mammifères, les cellules de plantes possèdent une paroi rigide laquelle empêche tout mouvement ou migration cellulaire ce qui établit aussi une limite dans le processus mitotique au sein d'un organe donné. En effet le nombre de cellule d'un organe comme la feuille est rapidement déterminé et ce fait au niveau du méristème axillaire (John and Qi 2008). Ensuite, la taille de la feuille ne dépend pratiquement que de processus d'élongation, de croissance cellulaire et d'augmentation du niveau de polyploïdie. Il est intéressant de noter que l'expression de CLINK ainsi que l'infection par le virus touche également le niveau de polyploïdie des cellules (Figure 4 publication n°1). Or, le processus de polyploïdie consiste en une succession de réplication de l'ADN sans division cellulaire. Ainsi nos résultats semblent indiquer que l'inhibition de RB conduit également à une stimulation de ce processus. Ainsi, après inhibition de RB, certaines cellules font un cycle cellulaire complet avec division alors que d'autres entrent dans un processus d'augmentation de leur niveau de ploïdie. On peut supposer que les différents types cellulaires présents au niveau même d'une feuille répondent différemment à l'inhibition de la protéine RB.

Enfin, pour expliquer l'effet inhibiteur de l'association CLINK-RB sur la fonction de la protéine, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Tout d'abord, l'association entre les deux protéines ce fait entre le domaine LxCxE de la protéine CLINK et le domaine « pocket » de RB. En effet, la protéine CLINK mutée pour ce domaine est incapable d'avoir un effet sur la fonction de RB (Figure 1 publication n°1). Or c'est le domaine « pocket » de RB qui assure la liaison avec les facteurs E2F. Il semble donc probable que la liaison RB-CLINK empêche l'interaction avec les facteurs E2F en occupant le domaine « pocket » de RB. D'autre part, la présence sur la protéine CLINK d'un domaine de liaison à la protéine SKP1 laisse supposer un lien entre CLINK et le protéasome. En effet, SKP1 est protéine qui intervient dans le processus d'ubiquitination des protéines avant leur dégradation par le protéasome (Ho *et al.* 2006). On peut donc imaginer que la liaison CLINK-RB permettrait d'entraîner la destruction de la protéine RB par cette voie de dégradation. Pour vérifier cette hypothèse il serait

intéressant de suivre l'accumulation de la protéine RB dans des cellules exprimant la protéine CLINK.

Notre étude sur l'impact de l'infection virale et en particulier de l'expression de la protéine CLINK sur la physiologie de la cellule végétale a permis de mettre en évidence un certain nombre de caractéristiques communes avec les animaux mais aussi certaines différences. Tout d'abord, comme chez les mammifères, l'inhibition de la fonction RB dans la cellule conduit à l'activation du cycle cellulaire. Cela indique que la protéine RB joue un rôle central dans le processus de régulation de la division de la cellule végétale. Cependant, l'inhibition de RB n'a pas conduit à une modification de l'accumulation des transcrits pol III ce qui suggère que la protéine RB des plantes n'est peut-être pas impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire contrairement à son homologue mammifère.

II. Le rôle des SINE dans la physiologie de la cellule végétale.

Chez l'homme, la transcription du SINE Alu est activée à la suite de certain stress comme l'infection virale ou le choc thermique (cf. paragraphe VII de la synthèse bibliographique). Le transcrit Alu est alors capable de lier la protéine kinase PKR, ce qui a pour conséquence l'inhibition de son activité. La reconnaissance du transcrit Alu par la PKR se fait au niveau de son domaine de liaison à l'ARN double brin. En effet, le transcrit Alu possède une structure secondaire constituée de nombreux segments d'appariement double brin (Sinnott *et al.* 1991). La PKR est une des kinases responsable de la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α chez les animaux (cf. paragraphe II.2 de la synthèse bibliographique). Sa phosphorylation par la PKR conduit à la diminution générale de la traduction dans la cellule. Ainsi, le SINE Alu est capable d'intervenir dans la régulation d'un processus clef de la cellule tel que le mécanisme de traduction.

Le but de notre analyse a été de voir si un tel mécanisme de contrôle par les SINE est conservé dans une cellule végétale. Avant cela, nous avons commencé par caractériser la voie

de contrôle de la traduction par eIF2 α chez les plantes puis nous avons étudié l'analyse de l'impact d'un élément SINE sur cette voie.

II.1. Il n'existe qu'une seule kinase d'eIF2 α dans le monde végétale : GCN2

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier l'ensemble des kinases d'eIF2 α présentes chez le riz et chez *Arabidopsis thaliana*. À l'aide du programme BLAST, nous avons recherché dans le génome d'*Arabidopsis* des gènes codant des protéines présentant des similarités de séquence avec le consensus du domaine kinase d'eIF2 α . Cette étude bioinformatique couplée à une analyse phylogénétique nous a permis d'identifier deux protéines d'*Arabidopsis* (GCN2 et la kinase Wee1-like) possédant un domaine kinase significativement proche des domaines présents chez les protéines kinases de mammifères (Figures S1 et S2 de la seconde publication). Cependant, seule la protéine GCN2 possède l'ensemble des caractéristiques d'une véritable kinase d'eIF2 α (présence de certains résidus clefs, insérés dans le domaine kinase).

Même si notre analyse semble indiquer que chez les monocotylédons et les dicotylédons GCN2 est la seule kinase d'eIF2 α , plusieurs études ont décrit l'existence d'une activité de type PKR chez les plantes (Langland *et al.* 1995; Langland *et al.* 1996; Hiddinga *et al.* 1988; Chang *et al.* 1999). Ces études réalisées chez le blé et le tabac montrent en effet que le facteur eIF2 α est phosphorylé à la suite d'une infection virale. Or, notre étude chez *Arabidopsis*, semble indiquer que GCN2 est probablement la seule kinase d'eIF2 α . Il serait donc intéressant d'étudier un éventuel rôle de GCN2 dans la réponse au stress viral.

II.2. Régulation de l'activité de GCN2 chez les plantes.

Notre analyse de GCN2 chez *Arabidopsis* a permis de montrer que la protéine GCN2 est bien une kinase d'eIF2 α . Comme pour ses homologues mammifères et de levure, son activation a lieu à la suite d'une carence en purine et en acides aminés. Chez les mammifères, la carence en un seul type d'acides aminés conduit à l'activation de GCN2 (cf. paragraphe II.1 de la synthèse bibliographique). Les végétaux sont des organismes autotrophes, c'est-à-dire qu'ils produisent leur propre matière organique à partir de carbone (CO₂ de l'atmosphère) et

d'azote inorganique (nitrates du sol ou N₂ atmosphérique). Ainsi, la carence en un seul type d'acide aminé n'est possible chez la plante que par l'utilisation d'inhibiteur des voies de synthèse des acides aminés. En effet, c'est une diminution de l'apport global en carbone et/ou azote qui conduit à un ralentissement général de la synthèse de l'ensemble des acides aminés. Les premiers résultats obtenus par la technique de purification TAP tag semblent indiquer que GCN2 est capable d'interagir avec l'ARNt valine (Figure 46). Plus généralement, nous avons montré que la carence en acides aminés branchés ou aromatiques conduit à l'activation de GCN2 (Figure 1 seconde publication). Ainsi, il semble que dans le monde végétal, la kinase GCN2 a conservé sa capacité de reconnaissance de l'ensemble des acides aminés. Cette activation par les ARNt conduit à la phosphorylation d'eIF2 α ce qui provoque la diminution de l'initiation de la traduction dans la cellule (Figure 6 de la seconde publication). Ce mécanisme de contrôle par eIF2 est d'ailleurs essentiel pour la survie de la plante en condition de stress (Figure 5 de la seconde publication)

Il apparaît également que des stimuli spécifiques aux plantes semblent aussi être capables d'activer la protéine GCN2. En effet, la blessure et l'application de certaines hormones (acide jasmonique, acide salicylique et éthylène) conduisent aussi à la phosphorylation d'eIF2 α par GCN2 (Figure S4 seconde publication). Ces hormones sont connues pour être produites en réponse à de nombreux stress biotiques et abiotiques tel que l'attaque par des insectes ou des pathogènes, des changements de condition du milieu extérieur ou des blessures. Il semble donc que, contrairement aux mammifères qui ont en leur possession quatre kinases d'eIF2 α répondant à des stress qui leurs sont spécifiques, les plantes, qui ne possèdent que la kinase GCN2, ont diversifié les stimuli capable d'activer cette protéine.

Le lien entre ces hormones de stress et l'activation de GCN2 reste cependant à être identifié. Il serait d'abord intéressant de voir l'impact des ces hormones sur l'activité d'une protéine GCN2 mutée au niveau de son domaine de liaison à l'ARNt. En effet, à ce jour, seule la liaison entre une molécule d'ARNt au niveau de ce domaine est capable d'activer la fonction kinase de la protéine chez la levure et chez les mammifères.

La similitude dans la cinétique de réponse entre la blessure et l'incubation avec le méthyl jasmonate semble indiquer que ces deux stimuli sont étroitement associés dans le mécanisme d'activation de GCN2. Il est d'ailleurs établi qu'une blessure conduit à la

production d'acide jasmonique au niveau des tissus vasculaires (Bowles 1997). Les UV, l' H_2O_2 et l'éthylène sont également capables d'induire la production d'acide jasmonate. D'autre part, la blessure conduit à l'activation de gènes de la voie de biosynthèse des acides aminés (Dyer *et al.* 1989). Enfin, il est intéressant de noter qu'une étude a montré que, à la suite d'une infection bactérienne, certains gènes intervenant dans la synthèse du tryptophane étaient activés (Zhao and Last 1996). Cette activation est dépendante de la présence d'acide salicylique, ce qui semble indiquer un lien entre la synthèse en acides aminés et la production de ces hormones de stress. Cependant même si ces hormones interagissent avec la biosynthèse des acides aminés, l'induction rapide (en moins de 30 min) de GCN2 par le méthyl jasmonate suggère l'existence d'un mécanisme d'induction plus rapide (Figure S4, seconde publication). En effet, l'ajout des inhibiteurs de la voie de synthèse des acides aminés comme le chlorsulfuron ou le glyphosate requiert un temps d'incubation de plusieurs heures (4 heures minimum) avant de voir une augmentation du niveau de phosphorylation d'eIF2 α . Il s'agit probablement du temps nécessaire pour épuiser le stock en acides aminés à l'intérieur de la cellule. La rapidité de réponse à ces hormones suggère donc que si l'activation de GCN2 passe par l'accumulation d'ARNt dans la cellule, l'effet ne se fait pas sur la voie de biosynthèse des acides aminés. D'autre part, on sait que rapidement après sa production, l'acide jasmonique se conjugue avec un acide aminé et c'est cette forme conjuguée qui intervient dans la défense contre les pathogènes (Howe and Jander 2008). Il semble donc envisageable que la production d'acide jasmonate à la suite d'un stress comme la blessure utilise rapidement le stock d'acides aminés présent dans la cellule via ce mécanisme de conjugaison ce qui conduit à l'accumulation d'ARNt libre lesquels vont venir activer GCN2.

Il serait intéressant de regarder si la réponse à ces différentes hormones conduit à une activation systémique de GCN2. En effet, à la suite d'une blessure localisée par exemple au niveau d'une feuille, la production locale d'hormone de stress conduit à la mise en place d'une réponse systémique chez la plante. Au cours de notre analyse, la blessure que nous avons réalisée n'a touché qu'un nombre relativement limité de cellules par rapport à la plante prise dans son ensemble. Or, notre analyse à la suite de la blessure a porté sur la plante entière et montre une forte phosphorylation d'eIF2 α . Cela suggère que la blessure induit une réponse générale chez la plante. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de blesser une feuille et de réaliser l'analyse du niveau de phosphorylation d'eIF2 α sur une autre feuille de la même plante.

Des analyses portant sur l'impact de GCN2 sur la réponse au stress causé par des insectes herbivores sont en cours. Pour cela, nous avons émis l'hypothèse que GCN2 pouvait être un atout dans la réponse à ce type de stress. En effet, une plante blessée par un insecte produit un certain nombre de métabolites secondaires toxiques ou répulsifs ce qui permet une protection contre les insectes (Howe and Jander 2008). Pour mettre en évidence cela, des plantes sauvages et des plantes mutantes pour GCN2 vont être mises en contact avec un insecte herbivore, *Pieris rapae* et l'analyse du poids de l'insecte va permettre de voir si l'absence de GCN2 conduit à une diminution des défenses de la plante.

Les végétaux sont des organismes immobiles, fixés au sol par l'intermédiaire de leurs racines, ils sont donc beaucoup plus sujets aux variations des conditions de leur environnement. Notre étude a montré que GCN2 est également activé à la suite d'un choc au froid et par l'ajout de cadmium dans le milieu.

En ce qui concerne l'activation de GCN2 à la suite d'un passage à 4°C, il est d'abord envisageable que la diminution de la température dans la cellule a des conséquences sur la biosynthèse des acides aminés et/ou sur le phénomène d'aminacylation. Il serait intéressant de voir si le choc thermique active toujours une protéine GCN2 mutée au niveau de son domaine de liaison aux ARNt. Alternativement, on pourrait utiliser la protéine GCN2 taggée avec le TAP tag afin de vérifier si des ARNt libres peuvent être co-purifiés avec GCN2 à la suite d'un passage à 4°C. D'autre part, le froid conduit également à l'activation de la production de l'acide abscissique ce qui permet de relier ce type de stress avec les hormones végétales (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 1996) (Xiong *et al.* 2002). Une autre hypothèse que l'on pourrait avancer au sujet de l'activation de GCN2 à la suite d'un choc thermique est que chez les plantes, comme chez la levure, l'activité de la kinase est en partie contrôlée par des chaperonnes (HSP70 et HSP90 chez la levure). Ainsi un passage au froid pourrait être responsable de la modification des protéines HSP associés à GCN2 ce qui aurait pour conséquence l'activation de la kinase. Il faut tout de même noter que l'augmentation de température ne semble pas conduire à l'activation de GCN2 chez la plante (résultat non présenté)

Nous avons mis en évidence que la présence de cadmium dans le milieu avait pour conséquence l'activation de GCN2 chez *Arabidopsis* (Figure 44). Chez la levure, l'activation

de GCN2 par le cadmium semble être la conséquence du stress oxydatif causé par l'accumulation de ce métal lourd. Or nous avons également testé l'impact de l'H₂O₂ sur l'activité de GCN2 et aucune phosphorylation d'eIF2 α n'a pu être observée en présence de cette molécule (Figure 3 de la seconde publication). Cela suggère que chez les plantes, GCN2 ne serait pas activée à la suite d'un stress oxydatif et que l'effet du cadmium passerait par un mécanisme qui restant encore à déterminer.

L'activation éventuelle de GCN2 à la suite d'une infection virale reste une voie d'étude intéressante. En effet, l'activation de la phosphorylation d'eIF2 α à la suite d'une infection virale chez certaines espèces laisse supposer que GCN2 pourrait avoir un rôle à jouer dans ce mécanisme. Nous sommes actuellement en train de tester l'impact de certains virus sur le mutant GCN2 pour voir si l'absence de cette protéine peut constituer un avantage pour le virus au cours de l'infection.

II.3. La phosphorylation d'eIF2 α et la traduction des uORF chez la plante.

Chez la levure et les mammifères, l'augmentation spécifique de la traduction des facteurs GCN4 et ATF4 suite à la phosphorylation d'eIF2 α fait intervenir la présence uORF au niveau des régions 5' UTR de leurs transcrits (cf. paragraphe II.7 de la synthèse bibliographique). En effet, lorsqu'eIF2 α est phosphorylé, la réinitiation de la traduction devient moins efficace. Nous avons donc essayé de voir si cette propriété était conservée chez les plantes. Pour cela, nous avons réalisé des expressions transitoires de gènes comportant des uORF au niveau de leurs 5' UTR dans des conditions où eIF2 α est phosphorylée. Les résultats obtenus ne permettent pas de conclure sur un éventuel effet de l'activation de GCN2 sur la traduction des gènes possédant des uORF (Figure 48). Le principal problème inhérent à cette analyse est le caractère transitoire qui nécessite la co-transformation d'un autre plasmide rapporteur afin de normaliser les valeurs obtenues. Or, il paraît clair que le plasmide rapporteur voit son activité modulée en fonction des stress appliqués. Une solution pour résoudre ce problème serait d'établir des lignées stables de plantes exprimant la construction utilisée. Cela permettrait de doser simplement la quantité totale de protéine contenue dans l'extrait avant de réaliser le test biochimique qui permet de quantifier l'activité traductionnelle

du rapporteur. D'autre part, notre première analyse a été réalisée sur des protoplastes ce qui rendait impossible la vérification du niveau de phosphorylation d'eIF2 α . Il est d'ailleurs possible que la méthode même d'obtention des protoplastes soit un stress suffisant pour induire l'activation de GCN2.

II.4. Recherche d'un homologue de GCN4 dans le monde végétal.

Chez la levure et les mammifères, la phosphorylation d'eIF2 α conduit à la traduction spécifique d'un facteur de transcription appartenant à la famille bZIP (GCN4 chez la levure et ATF4 chez les mammifères). Chez *Arabidopsis thaliana*, aucun homologue de ces facteurs n'a été mis en évidence. Cependant il existe chez les plantes un grand nombre de facteurs bZIP. Parmi eux, les facteurs bZIP appartenant à la classe S semblent être particulièrement intéressants. En effet, ces facteurs présentent un certain nombre de caractéristiques qui laissent supposer un rôle éventuel dans la voie d'activation de GCN2 (cf. paragraphe III.6 de la synthèse bibliographique). Tout d'abord, la majorité des ces facteurs présentent des uORF au niveau de leur région 5'UTR. Ensuite, l'activité de facteurs de transcription de certains de ces bZIP a été associée au contrôle de gènes intervenant dans la biosynthèse des acides aminés. Par exemple, le facteur bZIP11 appartient à cette classe S. L'apport en sucrose contrôle la traduction de son ARNm et la présence des uORF au niveau de son transcrit est essentiel dans ce mécanisme de régulation (Hanson *et al.* 2008). D'ailleurs des gènes intervenant dans la biosynthèse des acides aminés sont la cible de ce facteur bZIP11. Il serait donc intéressant d'étudier la régulation de la traduction de ce facteur en fonction du niveau de phosphorylation d'eIF2 α .

II.5. Conservation de la régulation générale des gènes de biosynthèse des acides aminés.

Notre analyse par Northern blot de l'accumulation de certains gènes intervenant dans les voies de biosynthèses des acides aminés semble confirmer qu'un mécanisme de régulation général est conservé chez les plantes (Figure 49). En effet, la carence d'un type d'acide aminé entraîne l'activation de gènes intervenant dans la biosynthèse d'acides aminés de voies

différentes. Cependant, les résultats que nous avons obtenus ne semblent pas indiquer que cette réponse soit dépendante de GCN2 comme c'est le cas chez la levure et chez les mammifères. Il est tout de même possible que nous n'ayons pas choisis les gènes contrôlés par le facteur bZIP dont la traduction est activée à la suite de la phosphorylation d'eIF2 α . Afin de mettre en évidence les gènes contrôlés par cette voie, il pourrait être intéressant de réaliser une étude de la transcription à grande échelle grâce à la technique du micro array. Il serait alors nécessaire de réaliser cette étude à la fois sur des plantes sauvages et sur des plantes mutantes pour GCN2 dans des conditions où eIF2 α est phosphorylée. L'irradiation par des rayonnements UV d'une part et la carence en acide aminés d'autre part permettrait de discriminer les gènes répondant spécifiquement à la phosphorylation d'eIF2 α des gènes régulés par ces stress mais *via* des mécanismes différents.

II.6. Impact des éléments SINE sur l'activité de GCN2.

Chez les animaux, la PKR, une des kinases d'eIF2 α a une activité qui peut être régulée par la présence de transcrits du SINE Alu. En effet, à la suite d'un stress, certains éléments Alu voient leurs transcriptions déreprimées (cf. paragraphe VII de la synthèse bibliographique). Les transcrits Alu vont alors être reconnus par la PKR ce qui a pour conséquence d'activer l'activité kinase de la protéine et donc d'inhiber la traduction. Dans le règne végétal, il semble qu'une seule protéine kinase d'eIF2 α soit présente, il s'agit de GCN2. Ainsi, nous avons voulu déterminer si l'activité kinase de cette protéine était elle aussi modulée en présence de transcrits SINE. Contrairement aux études menées avec des cellules animales, nous ne disposons pas de conditions pour lesquelles la transcription des SINE endogènes d'*Arabidopsis* est dérégulée. Cependant, nous avons à notre disposition une lignée de plante transgénique exprimant le SINE SB1 de *Brassica napus*. Ce système d'expression hétérologue nous permet d'avoir une expression importante d'un SINE de plante dans des cellules d'*Arabidopsis*. L'étude de l'activité kinase de GCN2 dans ce contexte de surexpression de SB1 semble indiquer que la présence de transcrit SINE ralentit l'activation de GCN2 à la suite d'une carence en acides aminés (Figure 47). Nous pouvons envisager que les transcrits SB1 sont capables de rentrer en compétition avec les ARNt libres pour la fixation au niveau du domaine HisRS de GCN2. Alternativement, il est possible que l'effet

des SINE sur GCN2 se fasse de manière indirecte. En effet, nous avons vu que SB1 est capable d'interagir et de moduler l'activité de protéines possédant un domaine de liaison aux ARN doubles brin (cf. paragraphe VII de la synthèse bibliographique). On peut penser que certaines de ces protéines sont capables de venir réguler l'activité de GCN2 lorsqu'elles sont associées avec un ARN SINE. Enfin il est envisageable que la réaction différentielle de C3I18 au chlorsulfuron provient d'un apport moins important de la molécule causé par la forte diminution de la taille des racines observée chez les plantes surexprimant le SINE. Les rayonnements UV semblent d'ailleurs activer GCN2 de manière identique chez les plantes C3I18 et chez les plantes sauvages. Pour vérifier l'effet direct du SINE sur l'activité de GCN2, il serait souhaitable de transformer une lignée C3I18 avec le gène codant pour la protéine GCN2 étiquetée avec le TAP tag. Cela permettra de voir si SB1 peut être co-purifié avec GCN2, ce qui constituera une évidence du rôle du SINE dans la régulation de la kinase chez les plantes.

Matériels et méthodes

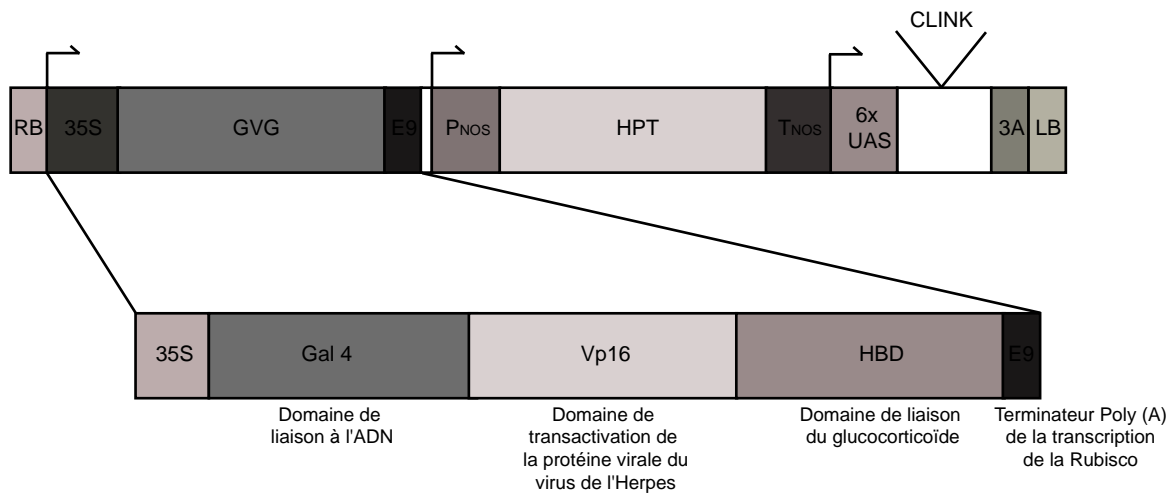
I. Matériel végétal.

I.1. Plantes *gcn2* mutantes.

Les plantes mutantes pour le gène *gcn2* (écotype Landsberg, Ler) ont été obtenues auprès au RIKEN Genomic Science Center. L'élément d'insertion DS est présenté dans la seconde publication (Figure S3). Les graines ont été semées *in vitro* sur un milieu solide MS (Murashige and Shoog ; Sigma) contenant 8 g d'agar par litre, supplémenté avec du saccharose (30g/litre) et ajusté à pH 5,7. Le milieu contient de la kanamycine (50 µg/ml) qui est le marqueur de sélection porté par l'élément.

I.2. Construction des plantes *gcn2* mut x GCN2 et *gcn2* mut x GCN2-TAP.

Les lignées de plantes mutantes d'*Arabidopsis* exprimant la protéine GCN2 ou la protéine GCN2 taguées TAP tag sont dérivées de la lignée mutante *gcn2*. Ces lignées de plantes ont été produites en utilisant la transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. Pour cela, le plasmide portant la construction d'intérêt est introduit par électroporation dans la souche d'*Agrobacterium* C58C1. L'agrobactérie ainsi obtenue est cultivée dans 5 ml de milieu 2YT (pré-culture) supplémenté en antibiotique (rifampicine 5 mg/l et hygromycine 50 mg/l). Après 24 heures de pré-culture, 2 ml de la préculture sont incubés dans 200 ml de milieu 2YT+ 2 ml de MgSO₄ 1M+ hygromycine (50 mg/l). La culture est mise sous agitation à 200 rpm et 28°C jusqu'à obtention d'une DO (à 600 nm) comprise entre 0.6 et 0.8. La culture d'agrobactéries est centrifugée (4000 g, 10 minutes) et le culot est repris dans 100 ml de milieu d'infiltration. Les transformations d'*A. thaliana*, écotype Columbia, sont faites sur des plantes adultes par la méthode dite du « floral dip » (Bechtold and Pelletier 1998). Les inflorescences des plantes sont alors trempées pendant 5 secondes dans le milieu d'infiltration qui contient les agrobactéries. Les plantes sont laissées dans la serre jusqu'à obtention de graines.



UAS: Gal 4 upstream activating sequence

RB: Right Border

LB: Left Border

HPT: Gène de résistance à l'hygromycine

T_{NOS}: Termineur de la transcription du gène codant pour la nopaline synthase

Figure 51: Structure du T-DNA présent dans les lignées Clink et Clink mutant.

Dans la protéine mutante, le site LxCxE est muté en un site LxRxA qui ne permet plus l'interaction avec la protéine Rb.

1.2.1) Les plantes C3I18.

La lignée C3I18 a été mise au point au laboratoire par Thierry Pélissier (Pelissier *et al.*, 2004). Brièvement, des plantes sauvages d'écotype Columbia ont été transformées avec un transgène portant le locus na7 du SINE SB1 de *Brassica napus*. L'accumulation des différentes formes du transcrit SINE a été confirmé par Northern blot et montre que la lignée C3I18 exprime SB1 de manière substantielle.

1.2.2) Plantes infectées par le virus FBNYV (Faba Bean Necrotic Yellow Virus).

Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Columbia au stade rosette (environ 15 jours) sont mises en contact avec un puceron (*Aphid crassivora*) porteur du virus. La lignée établie qui a été utilisée possède un locus SINE apporté par transgénèse. Il s'agit du locus na7 du SINE S1 de *Brassica napus* (cf paragraphe précédent). L'introduction du virus se fait simplement par les blessures infligées par le puceron et le virus peut alors se répliquer et s'accumuler dans tout l'organisme. L'infection virale provoque notamment chez la plante un certain niveau de nanisme.

Après une période d'incubation de 9 jours, les insectes sont éliminés. 18 jours après l'infection (DPI) les plantes entières sont congelées individuellement dans de l'azote liquide et stockées à -80°C. Les plantes ont été traitées à l'Institut des Sciences du Végétale (CNRS, Gif sur Yvette, France). Le lot de plantes 18 DPI possède un taux d'infection attendu de 90% environ. Pour chacune de ces expériences, des plantes contrôles ont été mises en contact avec des pucerons sains (non porteur du virus) et traitées de manière similaire.

1.2.3) Plantes transgéniques CLINK et conditions d'induction.

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Columbia) à notre disposition possèdent le transgène présenté en Figure 51. Le promoteur 35S permet d'induire une expression constitutive d'un récepteur nucléaire recombinant possédant un domaine Gal 4 de liaison à l'ADN associé à un domaine activateur VP16. La fonction transactivatrice du récepteur est

activée uniquement lorsque le ligand (un glucocorticoïde) est fixé au domaine récepteur des glucocorticoïdes. Ainsi, en présence de dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, le récepteur va permettre la transactivation de l'expression du gène codant pour la protéine CLINK. Deux types de lignées avaient été établies au laboratoire : des plantes exprimant la protéine CLINK native et d'autres exprimant une forme mutante de la protéine au niveau du site de liaison potentiel à la protéine RB.

Après sélection de certaines lignées transformées, des graines (génération T3) sont semées *in vitro* sur un milieu solide MS contenant de l'hygromycine (20 µg/ml) qui est le marqueur de sélection porté par le transgène. Après 15 jours à 23°C en chambre climatique les plantules sont repiquées sur terreau et sont transférées à la serre.

Les expériences d'induction du transgène ont été réalisées en incubant les feuilles de ces plantes dans des tubes Falcon contenant une solution aqueuse de dexaméthasone (concentration finale : 15 µM, par dilution d'une solution mère obtenue par dissolution du dexaméthasone dans de l'éthanol absolu). D'autres feuilles ont été incubées dans une solution contrôle contenant uniquement le même volume d'éthanol. Les feuilles sont incubées pendant 0, 2, 5, 24 ou 48 heures, et l'incubation est immédiatement suivie par l'extraction de leur ARN.

II. Conditions de stress utilisées.

Pour l'analyse de l'impact du cadmium sur la phosphorylation d'eIF2 α , des plantules sauvages de 10 jours ont été transférées dans un milieu MS liquide contenant du CdCl₂ à la concentration finale de 200 µM pendant 24H.

Pour l'analyse de la phosphorylation d'eIF2 α dans un contexte de surexpression du SINE SB1, des plantes sauvages d'écotype Columbia ou des plantes C3I18 de 10 jours ont été transférées dans un milieu liquide contenant 0,6 µM final de Chlorsulfuron pendant les temps d'incubation indiqués. Parallèlement, des plantules ont été irradiées par des rayonnements UV (50 mJ/m²) à l'aide d'un Crosslinker (BioRad).

Pour l'analyse par Northern blot du mutant *gcn2*, des plantules sauvages et mutantes ont été traitées avec du chlorsulfuron ou par les UV comme précédemment ou avec un homologue de la purine: le 8-aza-Adénine (azA) à une concentration finale de 50 µg/mL.

III. Extraction d'ADN génomique

Deux feuilles de jeunes plantules (1 à 2 mois) sont broyées dans 500 µl de tampon d'extraction (Annexe 1). Les échantillons sont homogénéisés avec 500 µl de phénol/CIA, puis centrifugés 15 minutes à 4000 rpm. La phase supérieure est récupérée, puis l'ADN est précipité avec 0,7 volume d'isopropanol pendant 10 minutes à température ambiante, suivi d'une centrifugation de 15 minutes à 13000 rpm. Le culot d'ADN est lavé deux fois à l'éthanol 70%, puis séché. Il est ensuite repris dans 250 µl de tampon TE IX (Annexe 1) contenant de la RNase A à 10 µg/ml. Après une incubation de 25 minutes à 37°C, la RNase A est éliminée par une extraction phénolique. L'ADN est précipité de façon standard (ajout de 0.02 volume de NaCl 5M et de 2,5 volumes d'éthanol 100%), centrifugé à 13000 rpm, puis lavé à l'éthanol 70% et repris dans 50 µl d'eau.

IV. PCR

0,1 µg d'ADN sont utilisés pour chaque réaction de PCR. L'enzyme Goldstar est utilisée selon les conditions préconisées par le fournisseur (Eurogentec), avec une température d'annealing de 2 degrés inférieur à la plus basse T_m des amorces employées. Les amorces utilisées sont indiquées en annexe 5.

V. Extraction d'ARN totaux

50 à 100 mg de feuilles sont homogénéisés dans un tube eppendorf avec du sable et 500 µl de tampon guanidine (Annexe 2). L'ARN est purifié par deux étapes d'extraction phénol/CIA, puis précipité au moins 20 minutes à -20°C en présence de 0,2 volume d'acide acétique 1M et 0,7 volume d'éthanol 100%. Après 30 minutes de centrifugation à 10000 rpm et à 4°C, le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol 70%, puis repris dans 30 µl d'eau traitée au DEPC.

VI. Hybridation northern

VI.1. Détection d'ARN en gel Mops-agarose

Après dénaturation 10 minutes à 65°C dans le tampon de charge, 5 µg d'ARN (pour la partie I des résultats) ou 25 µg (pour la partie II des résultats) sont séparés par migration dans un gel MOPS-agarose, sur la nuit à 50 V. Ensuite, le gel est rincé 2 fois 15 minutes dans un grand volume d'eau et équilibré dans du SSC 20X. Les ARN sont transférés sur une membrane Hybond-N+ (GE Healthcare) par capillarité avec du SSC 20X, puis fixés par exposition aux UV dans un crosslinker (Bio-Rad). Après une étape de pré-hybridation d'au moins 2 heures à 42°C, la membrane est hybridée sur la nuit à 42°C avec une sonde marquée à l' $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP préparée à l'aide du kit Megaprime (GE Healthcare) suivant les conditions du fournisseur. La membrane est rincée dans une solution 1X SSC-1% SDS 15 minutes à 42°C et 15 minutes à 65°C, puis deux fois 15 minutes dans une solution 0.1X SSC1% SDS à 65°C. Les signaux obtenus après exposition ont été dosés à l'aide d'un phosphoimager (BioRad). Les différentes solutions employées dans ces expériences sont détaillées dans l'annexe 2.

VI.2. Détection d'ARN de bas poids moléculaire en gel polyacrylamide (PAA)

Après dénaturation dans 1,5 volume de tampon de charge, 6 µg d'ARN sont séparés par migration dans un gel PAA 7% (19/1 Acryl/Bis-Acrylamide), 7,5M urée, TBE 1X pendant 4 heures à 570 V et avec du TBE 1X comme tampon de migration. Après séparation, les ARN sont transférés sur une membrane Hybond-XL (GE Healthcare) par transfert électrique dans du TBE 1X, puis fixés par exposition aux UV. La synthèse de la sonde et les conditions d'hybridation utilisées sont les mêmes que pour la détection des ARN séparés en gel MOPS-agarose. Les différentes solutions employées dans ces expériences sont détaillées dans l'annexe 2.

VII. RT-PCR des éléments SINE endogènes

3 µg d'ARN sont traités avec 3 µl de DNase I (10 µ/µl ; Roche) pendant 25 minutes à 25°C dans un volume de 100 µl d'eau traitée au DEPC. L'ARN est ensuite purifié par une extraction phénol-CIA puis précipité. L'ARN est resuspendu dans 10 µl d'eau traitée au DEPC et après dosage, 500 ng de cet ARN est reverse transcrit en présence d'hexanucléotides et de 20 unités d'Expand Reverse Transcriptase dans un volume final de 20 µl et suivant les conditions du fournisseur (Batsche *et al.*). Suite à la reverse transcription, 1 µl de la réaction est utilisé pour l'amplification PCR comme décrit dans le paragraphe IV.

VIII. Western blot.

L'extraction protéique est réalisée de la manière suivante : 3 plantules sont broyées dans du tampon Laemmli 1X (BioRad) supplémenté avec du cocktail phosphatase PhosStop et du cocktail inhibiteur de protéase Complete (Batsche, Desroches, Bilodeau, Gauthier and Drouin) selon les conditions du fournisseur. Le broyat est ensuite incubé 5 min à 95°C puis centrifugé 10 min à 10 000G. La concentration en protéines du surnageant est dosé à l'aide du kit RC/DC Protein Assay (Biorad). 35 µg de protéines sont ensuite utilisé pour la séparation sur gel de polyacrylamide 10%. Après transfert semi sec (BioRad) pendant 45 min à 20 V, la membrane de nitrocellulose est saturée dans du TBS 1X BSA 5%. L'ensemble des incubations a ensuite été réalisé dans du TBS 1X BSA 1%.

Les conditions d'hybridation et les anticorps utilisés dans l'immunodetection d'eIF2α et de la tubuline sont indiqués dans la seconde publication.

Pour la détection de la protéine GCN2-CTAP, l'anticorps Peroxydase anti-péroxydase (PAP, SIGMA P-2026) est utilisé à une dilution au 1/5000.

IX. Préparation et transformation transitoire de protoplastes d'*Arabidopsis*

Des feuilles de rosettes de plantes de 3 semaines environ ont été découpées en fines lamelles à l'aide d'une lame de rasoir. Les lamelles sont ensuite incubées dans une solution

enzymatique (préparer un mélange : 1% cellulase, 1,25 ‰ macérozyme, 400 mM mannitol, 20 mM KCl, 20 mM MES-KOH pH 5,8 ; chauffer 10 minutes à 55°C puis ajouter 10 mM CaCl₂, 0,1% BSA ; stériliser par filtration) et incubées 2 heures sous vide à température ambiante. La suspension de protoplastes est passée sur un filtre de nylon (35-75 microns) pour éliminer les feuilles qui n'ont pas été digérées. Les protoplastes sont culottés en centrifugeant 1 min à 100 g (accélération et freinage minimums), puis lavés une fois dans 30 mL de solution W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5mM Glucose, 0,03% MES, ajuster le pH à 5.8 avec une solution de KOH 1 M). Les protoplastes sont finalement repris dans du W5 à une concentration d'environ 1×10^5 protoplastes par mL (approximativement 5 mL de W5 pour 25 mL de cellules en suspension).

Pour une transformation transitoire, les protoplastes sont incubés 30 minutes sur de la glace, puis repris dans une solution de MaMg (15mM MgCl₂, 400 mM Mannitol et 5 mM Mes-KOH pH 5,8), à une concentration d'environ 1×10^5 protoplastes par mL. 10 µg d'ADN plasmidique (1 µg/µL) sont mélangés avec 100 µL de la suspension de protoplastes, puis à 1 volume (110 µL) de solution 40% PEG (pour 10 mL : 4g de PEG4000 (#81240, Fluka), 2,5 mL de Mannitol 800 mM, 1 mL de CaCl₂ 1M et 3 mL d'H₂O). La suspension est incubée 30 minutes à température ambiante, puis diluée dans 4 volumes de solution W5 (mélanger très doucement). Les protoplastes sont ensuite culottés par centrifugation, 5 minutes à 80 g, et le surnageant écarté. Les protoplastes sont finalement repris dans 1 mL de W5 et incubés sur la nuit à 23°C, dans l'obscurité

X. TEST LUCIFERASE

Le système Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) permet d'analyser l'activité de 2 rapporteurs de manière quasiment concomitante. En effet les activités des luciférase de type Firefly et Renilla sont mesurés séquentiellement à partir du même échantillon selon les conditions préconisées par le fournisseur. La luciférase Firefly est mesurée en premier par l'ajout du premier réactif (Luciferase Assay Reagent II) qui génère un premier signal lumineux. Après quantification par un luminomètre, la première réaction est stoppée et la réaction faisant intervenir la Renilla luciferase est initiée simultanément par

l'ajout du réactif « Stop & Glo » dans l'échantillon. Le second signal lumineux est alors mesuré.

XI. PURIFICATION TAP TAG

Les plantes sont d'abord récoltées puis placées dans 2 volumes de tampon PBS 1X à 4°C contenant 1% de formaldéhyde (v/v). Le mélange est ensuite placé sous une cloche à vide pendant 30 min. La réaction de crosslink est ensuite stoppée par addition de glycine pH7 à une concentration finale de 0.25M. Après 2 lavages avec du PBS 1X (centrifugation 4 min à 300g), les plantules sont congelées dans l'azote liquide et broyées au mortier. La poudre obtenue est reprise dans 3 volumes de tampon avec inhibiteurs (Annexe 4) puis centrifugée 30 min à 4180 g à 4°C. Le surnageant obtenu est mis en contact avec 200 µl de résine IgG sépharose 6 Fast Flow préalablement équilibré dans du tampon avec inhibiteur sous agitation douce pendant 2H à 4°C. Après une centrifugation 3 min à 150g, la résine est rincée 5 fois avec 1 mL de tampon sans inhibiteur (Annexe 4). La résine est ensuite reprise dans 1 mL de tampon TEV (Annexe 4) contenant 2 unités de TEV protéase et laissée sous agitation 2H à 18°C. L'éluat de la digestion est récupéré par étape de centrifugation de 3 min à 150g. Après 3 rinçages avec du tampon TEV, l'ensemble des éluats obtenus est mélangé avec 3 volumes de tampon CAM (Annexe 4) et 50 µl de résines calmoduline. Après 3H à 4°C sous agitation lente, la résine est rincée 3 fois avec 1 mL de tampon CAM. Enfin, l'élution est réalisée avec 5 fois 1 volume de tampon élution CAM (Annexe 4).

Avant l'extraction des ARN, le crosslink est reversé par ajout de SDS (1% final) à l'éluat et incubation à 70°C pendant 45 min. L'ARN est ensuite purifié par deux étapes d'extraction phénol/CIA, puis précipité au moins 20 minutes à -20°C en présence de 0,2 volume d'acide acétique 1M et 0,7 volume d'éthanol 100%. Après 30 minutes de centrifugation à 10000 rpm et à 4°C, le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol 70%, puis repris dans 30 µl d'eau traitée au DEPC. Les ARN précipités à partir d'extraits natifs ou après purification TAP tag de la protéine taguées TAP sont d'abord traités avec le kit "DNA-free" (Ambion), suivant le protocole "Rigorous DNase treatment" du fabricant. Une partie des ARN (1/5^{ème}) est rétrotranscrite à l'aide de l'"expand reverse transcriptase" (Batsche, Desroches, Bilodeau,

Gauthier and Drouin) et d'amorces aléatoires (hexanucléotides). Les ADNc ainsi obtenus sont ensuite amplifiés par PCR à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques de l'ARNt Valine (Annexe 5).

Références bibliographiques

- Abastado, J.P., Miller, P.F., Jackson, B.M. and Hinnebusch, A.G. (1991) Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for GCN4 translational control. *Mol Cell Biol*, 11, 486-496.
- Ach, R.A., Taranto, P. and Gruissem, W. (1997) A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals. *Plant Cell*, 9, 1595-1606.
- The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. (2000) *Science*, 287, 2185-2195.
- Adams, P.D., Li, X., Sellers, W.R., Baker, K.B., Leng, X., Harper, J.W., Taya, Y. and Kaelin, W.G., Jr. (1999) Retinoblastoma protein contains a C-terminal motif that targets it for phosphorylation by cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*, 19, 1068-1080.
- Adeniyi-Jones, S. and Zaslloff, M. (1985) Transcription, processing and nuclear transport of a B1 Alu RNA species complementary to an intron of the murine alpha-fetoprotein gene. *Nature*, 317, 81-84.
- Airas, R.K. (1988) ATP-induced activation of the aminoacylation of tRNA by the isoleucyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 176, 359-363.
- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A. and Pestell, R.G. (1995) Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem*, 270, 23589-23597.
- Albani, D., Mariconti, L., Ricagno, S., Pitto, L., Moroni, C., Helin, K. and Cella, R. (2000) DcE2F, a functional plant E2F-like transcriptional activator from *Daucus carota*. *J Biol Chem*, 275, 19258-19267.
- Aleman, C., Roy-Engel, A.M., Shaikh, T.H. and Deininger, P.L. (2000) Cis-acting influences on Alu RNA levels. *Nucleic Acids Res*, 28, 4755-4761.
- Allen, T.A., Von Kaenel, S., Goodrich, J.A. and Kugel, J.F. (2004) The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 816-821.
- Alvarez, M.E. (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol*, 44, 429-442.
- Amanatullah, D.F., Zafonte, B.T., Albanese, C., Fu, M., Messiers, C., Hassell, J. and Pestell, R.G. (2001) Ras regulation of cyclin D1 promoter. *Methods Enzymol*, 333, 116-127.
- Araki, K., Nakajima, Y., Eto, K. and Ikeda, M.A. (2003) Distinct recruitment of E2F family members to specific E2F-binding sites mediates activation and repression of the E2F1 promoter. *Oncogene*, 22, 7632-7641.
- Arnaud, P., Goubely, C., Pelissier, T. and Deragon, J.M. (2000) SINE retroposons can be used in vivo as nucleation centers for de novo methylation. *Mol Cell Biol*, 20, 3434-3441.
- Arnaud, P., Yukawa, Y., Lavie, L., Pelissier, T., Sugiura, M. and Deragon, J.M. (2001) Analysis of the SINE S1 Pol III promoter from *Brassica*; impact of methylation and influence of external sequences. *Plant J*, 26, 295-305.
- Aronson, M.N., Meyer, A.D., Gyorgyey, J., Katul, L., Vetten, H.J., Gronenborn, B. and Timchenko, T. (2000) CLINK, a nanovirus-encoded protein, binds both pRB and SKP1. *J Virol*, 74, 2967-2972.
- Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G. and Fafournoux, P. (2004) Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem*, 279, 5288-5297.
- Babich, V., Aksenov, N., Alexeenko, V., Oei, S.L., Buchlow, G. and Tomilin, N. (1999) Association of some potential hormone response elements in human genes with the Alu family repeats. *Gene*, 239, 341-349.

- Bagchi, S., Raychaudhuri, P. and Nevins, J.R. (1990) Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell*, 62, 659-669.
- Bailey, J.A., Liu, G. and Eichler, E.E. (2003) An Alu transposition model for the origin and expansion of human segmental duplications. *Am J Hum Genet*, 73, 823-834.
- Bandara, L.R., Buck, V.M., Zamanian, M., Johnston, L.H. and La Thangue, N.B. (1993) Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *Embo J*, 12, 4317-4324.
- Batsche, E., Desroches, J., Bilodeau, S., Gauthier, Y. and Drouin, J. (2005) Rb enhances p160/SRC coactivator-dependent activity of nuclear receptors and hormone responsiveness. *J Biol Chem*, 280, 19746-19756.
- Bauer, B.N., Rafie-Kolpin, M., Lu, L., Han, A. and Chen, J.J. (2001) Multiple autophosphorylation is essential for the formation of the active and stable homodimer of heme-regulated eIF2alpha kinase. *Biochemistry*, 40, 11543-11551.
- Bechtold, N. and Pelletier, G. (1998) In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol*, 82, 259-266.
- Beck, T. and Hall, M.N. (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402, 689-692.
- Bell, S.P., Learned, R.M., Jantzen, H.M. and Tjian, R. (1988) Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science*, 241, 1192-1197.
- Berezutskaya, E., Yu, B., Morozov, A., Raychaudhuri, P. and Bagchi, S. (1997) Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ*, 8, 1277-1286.
- Berger, S. (2002) Jasmonate-related mutants of Arabidopsis as tools for studying stress signaling. *Planta*, 214, 497-504.
- Berlanga, J.J., Herrero, S. and de Haro, C. (1998) Characterization of the hemin-sensitive eukaryotic initiation factor 2alpha kinase from mouse nonerythroid cells. *J Biol Chem*, 273, 32340-32346.
- Berlanga, J.J., Santoyo, J. and De Haro, C. (1999) Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *Eur J Biochem*, 265, 754-762.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. and Ron, D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2, 326-332.
- Bilgin, D.D., Liu, Y., Schiff, M. and Dinesh-Kumar, S.P. (2003) P58(IPK), a plant ortholog of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis. *Dev Cell*, 4, 651-661.
- Blumwald, E., Aharon, G.S. and Apse, M.P. (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta*, 1465, 140-151.
- Bogenhagen, D.F. and Brown, D.D. (1981) Nucleotide sequences in Xenopus 5S DNA required for transcription termination. *Cell*, 24, 261-270.
- Boniotti, M.B. and Gutierrez, C. (2001) A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J*, 28, 341-350.
- Bookstein, R., Rio, P., Madreperla, S.A., Hong, F., Allred, C., Grizzle, W.E. and Lee, W.H. (1990) Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 7762-7766.

- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J. and Eilers, M. (1999) Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J*, 18, 5321-5333.
- Boudolf, V., Vlieghe, K., Beemster, G.T., Magyar, Z., Torres Acosta, J.A., Maes, S., Van Der Schueren, E., Inze, D. and De Veylder, L. (2004) The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in Arabidopsis. *Plant Cell*, 16, 2683-2692.
- Bowles, D.J. (1997) The wound response of tomato plants: analysis of local and long-range signalling events. *Essays Biochem*, 32, 161-169.
- Boyce, M., Bryant, K.F., Jousse, C., Long, K., Harding, H.P., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ma, D., Coen, D.M., Ron, D. and Yuan, J. (2005) A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*, 307, 935-939.
- Bracken, A.P., Ciro, M., Cocito, A. and Helin, K. (2004) E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci*, 29, 409-417.
- Bradfield, J.Y., Locke, J. and Wyatt, G.R. (1985) An ubiquitous interspersed DNA sequence family in an insect. *DNA*, 4, 357-363.
- Branzei, D. and Foiani, M. (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 297-308.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, 391, 597-601.
- Brown, V.D., Phillips, R.A. and Gallie, B.L. (1999) Cumulative effect of phosphorylation of pRB on regulation of E2F activity. *Mol Cell Biol*, 19, 3246-3256.
- Bruhat, A., Cherasse, Y., Maurin, A.C., Breitwieser, W., Parry, L., Deval, C., Jones, N., Jousse, C. and Fafournoux, P. (2007) ATF2 is required for amino acid-regulated transcription by orchestrating specific histone acetylation. *Nucleic Acids Res*, 35, 1312-1321.
- Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulic, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C., Jr. and Abraham, R.T. (1997) Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*, 277, 99-101.
- Brush, M.H., Weiser, D.C. and Shenolikar, S. (2003) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol*, 23, 1292-1303.
- Buchkovich, K., Duffy, L.A. and Harlow, E. (1989) The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*, 58, 1097-1105.
- Buratowski, S. and Zhou, H. (1992) A suppressor of TBP mutations encodes an RNA polymerase III transcription factor with homology to TFIIB. *Cell*, 71, 221-230.
- Cao, L., Faha, B., Dembski, M., Tsai, L.H., Harlow, E. and Dyson, N. (1992) Independent binding of the retinoblastoma protein and p107 to the transcription factor E2F. *Nature*, 355, 176-179.
- Castellano, M.M., del Pozo, J.C., Ramirez-Parra, E., Brown, S. and Gutierrez, C. (2001) Expression and stability of Arabidopsis CDC6 are associated with endoreplication. *Plant Cell*, 13, 2671-2686.
- Cavanaugh, A.H., Hempel, W.M., Taylor, L.J., Rogalsky, V., Todorov, G. and Rothblum, L.I. (1995) Activity of RNA polymerase I transcription factor UBF blocked by Rb gene product. *Nature*, 374, 177-180.

- Chaboute, M.E., Clement, B., Sekine, M., Philipps, G. and Chaubet-Gigot, N. (2000) Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotide reductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *Plant Cell*, 12, 1987-2000.
- Chan, H.M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Demonacos, C. and La Thangue, N.B. (2001) Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol*, 3, 667-674.
- Chang, L.Y., Yang, W.Y., Browning, K. and Roth, D. (1999) Specific in vitro phosphorylation of plant eIF2alpha by eukaryotic eIF2alpha kinases. *Plant Mol Biol*, 41, 363-370.
- Chang, L.Y., Yang, W.Y. and Roth, D. (2000) Functional complementation by wheat eIF2alpha in the yeast GCN2-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 279, 468-474.
- Chaubet-Gigot, N. (2000) Plant A-type cyclins. *Plant Mol Biol*, 43, 659-675.
- Chefalo, P.J., Oh, J., Rafie-Kolpin, M., Kan, B. and Chen, J.J. (1998) Heme-regulated eIF-2alpha kinase purifies as a hemoprotein. *Eur J Biochem*, 258, 820-830.
- Chellappan, S., Kraus, V.B., Kroger, B., Munger, K., Howley, P.M., Phelps, W.C. and Nevins, J.R. (1992) Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 4549-4553.
- Chen, H., Pan, Y.X., Dudenhausen, E.E. and Kilberg, M.S. (2004) Amino acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive basic region/leucine zipper transcription factors as well as localized histone acetylation. *J Biol Chem*, 279, 50829-50839.
- Chen, J.J., Pal, J.K., Petryshyn, R., Kuo, I., Yang, J.M., Throop, M.S., Gehrke, L. and London, I.M. (1991) Amino acid microsequencing of internal tryptic peptides of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit kinase: homology to protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 315-319.
- Chen, P.L., Scully, P., Shew, J.Y., Wang, J.Y. and Lee, W.H. (1989) Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell*, 58, 1193-1198.
- Cherkasova, V.A. and Hinnebusch, A.G. (2003) Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2. *Genes Dev*, 17, 859-872.
- Chesnokov, I. and Schmid, C.W. (1996) Flanking sequences of an Alu source stimulate transcription in vitro by interacting with sequence-specific transcription factors. *J Mol Evol*, 42, 30-36.
- Chow, K.N. and Dean, D.C. (1996) Domains A and B in the Rb pocket interact to form a transcriptional repressor motif. *Mol Cell Biol*, 16, 4862-4868.
- Christensen, J.B. and Imperiale, M.J. (1995) Inactivation of the retinoblastoma susceptibility protein is not sufficient for the transforming function of the conserved region 2-like domain of simian virus 40 large T antigen. *J Virol*, 69, 3945-3948.
- Chu, P.W. and Helms, K. (1988) Novel virus-like particles containing circular single-stranded DNAs associated with subterranean clover stunt disease. *Virology*, 167, 38-49.
- Chu, W.M., Ballard, R., Carpick, B.W., Williams, B.R. and Schmid, C.W. (1998) Potential Alu function: regulation of the activity of double-stranded RNA-activated kinase PKR. *Mol Cell Biol*, 18, 58-68.

- Chu, W.M., Wang, Z., Roeder, R.G. and Schmid, C.W. (1997) RNA polymerase III transcription repressed by Rb through its interactions with TFIIB and TFIIC2. *J Biol Chem*, 272, 14755-14761.
- Ciarmatori, S., Scott, P.H., Sutcliffe, J.E., McLees, A., Alzuherri, H.M., Dannenberg, J.H., te Riele, H., Grummt, I., Voit, R. and White, R.J. (2001) Overlapping functions of the pRb family in the regulation of rRNA synthesis. *Mol Cell Biol*, 21, 5806-5814.
- Cigan, A.M., Feng, L. and Donahue, T.F. (1988) tRNAi(met) functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation. *Science*, 242, 93-97.
- Cigan, A.M., Pabich, E.K., Feng, L. and Donahue, T.F. (1989) Yeast translation initiation suppressor sui2 encodes the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 and shares sequence identity with the human alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2784-2788.
- Claudio, P.P., Howard, C.M., Baldi, A., De Luca, A., Fu, Y., Condorelli, G., Sun, Y., Colburn, N., Calabretta, B. and Giordano, A. (1994) p130/pRb2 has growth suppressive properties similar to yet distinctive from those of retinoblastoma family members pRb and p107. *Cancer Res*, 54, 5556-5560.
- Cobrinik, D., Whyte, P., Peeper, D.S., Jacks, T. and Weinberg, R.A. (1993) Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein. *Genes Dev*, 7, 2392-2404.
- Cole, J.L. (2007) Activation of PKR: an open and shut case? *Trends Biochem Sci*, 32, 57-62.
- Collis, S.J., DeWeese, T.L., Jeggo, P.A. and Parker, A.R. (2005) The life and death of DNA-PK. *Oncogene*, 24, 949-961.
- Comai, L., Tanese, N. and Tjian, R. (1992) The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell*, 68, 965-976.
- Connor, J.H., Weiser, D.C., Li, S., Hallenbeck, J.M. and Shenolikar, S. (2001) Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol*, 21, 6841-6850.
- Correa, L.G., Riano-Pachon, D.M., Schrago, C.G., dos Santos, R.V., Mueller-Roeber, B. and Vincentz, M. (2008) The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS ONE*, 3, e2944.
- Crosby, J.S., Lee, K., London, I.M. and Chen, J.J. (1994) Erythroid expression of the heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Mol Cell Biol*, 14, 3906-3914.
- Crouch, D. and Safer, B. (1980) Purification and properties of eIF-2 phosphatase. *J Biol Chem*, 255, 7918-7924.
- Curtin, S.J., Watson, J.M., Smith, N.A., Eamens, A.L., Blanchard, C.L. and Waterhouse, P.M. (2008) The roles of plant dsRNA-binding proteins in RNAi-like pathways. *FEBS Lett*, 582, 2753-2760.
- Dahiya, A., Gavin, M.R., Luo, R.X. and Dean, D.C. (2000) Role of the LXCXE binding site in Rb function. *Mol Cell Biol*, 20, 6799-6805.
- Daniels, G.R. and Deininger, P.L. (1985) Repeat sequence families derived from mammalian tRNA genes. *Nature*, 317, 819-822.
- Dannenberg, J.H., van Rossum, A., Schuijff, L. and te Riele, H. (2000) Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev*, 14, 3051-3064.
- Dar, A.C., Dever, T.E. and Sicheri, F. (2005) Higher-order substrate recognition of eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell*, 122, 887-900.

- Das, S., Maiti, T., Das, K. and Maitra, U. (1997) Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) with the beta-subunit of eIF2. *J Biol Chem*, 272, 31712-31718.
- De Angelis, R., Iezzi, S., Bruno, T., Corbi, N., Di Padova, M., Floridi, A., Fanciulli, M. and Passananti, C. (2003) Functional interaction of the subunit 3 of RNA polymerase II (RPB3) with transcription factor-4 (ATF4). *FEBS Lett*, 547, 15-19.
- De Benedetti, A. and Baglioni, C. (1985) Kinetics of dephosphorylation of eIF-2(alpha P) and reutilization of mRNA. *J Biol Chem*, 260, 3135-3139.
- de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R. and Leone, G. (2003) Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem*, 278, 42041-42049.
- de Haro, C., Mendez, R. and Santoyo, J. (1996) The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J*, 10, 1378-1387.
- de Jager, S.M., Menges, M., Bauer, U.M. and Murra, J.A. (2001) Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant Mol Biol*, 47, 555-568.
- de la Luna, S., Burden, M.J., Lee, C.W. and La Thangue, N.B. (1996) Nuclear accumulation of the E2F heterodimer regulated by subunit composition and alternative splicing of a nuclear localization signal. *J Cell Sci*, 109 (Pt 10), 2443-2452.
- De Luca, A., MacLachlan, T.K., Bagella, L., Dean, C., Howard, C.M., Claudio, P.P., Baldi, A., Khalili, K. and Giordano, A. (1997) A unique domain of pRb2/p130 acts as an inhibitor of Cdk2 kinase activity. *J Biol Chem*, 272, 20971-20974.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., de Almeida Engler, J., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van Der Schueren, E., Jacqmard, A., Engler, G. and Inze, D. (2002) Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J*, 21, 1360-1368.
- De Virgilio, C. and Loewith, R. (2006) The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 1476-1481.
- DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.Y., Huang, C.M., Lee, W.H., Marsilio, E., Paucha, E. and Livingston, D.M. (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, 54, 275-283.
- Deininger, P.L., Jolly, D.J., Rubin, C.M., Friedmann, T. and Schmid, C.W. (1981) Base sequence studies of 300 nucleotide renatured repeated human DNA clones. *J Mol Biol*, 151, 17-33.
- del Pozo, J.C., Boniotti, M.B. and Gutierrez, C. (2002) Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell*, 14, 3057-3071.
- del Pozo, J.C., Diaz-Trivino, S., Cisneros, N. and Gutierrez, C. (2006) The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18, 2224-2235.
- Deppmann, C.D., Acharya, A., Rishi, V., Wobbes, B., Smeekens, S., Taparowsky, E.J. and Vinson, C. (2004) Dimerization specificity of all 67 B-ZIP motifs in Arabidopsis thaliana: a comparison to Homo sapiens B-ZIP motifs. *Nucleic Acids Res*, 32, 3435-3445.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C. and Meyer, C. (2007) The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep*, 8, 864-870.

- Deragon, J.M., Gilbert, N., Rouquet, L., Lenoir, A., Arnaud, P. and Picard, G. (1996) A transcriptional analysis of the S1Bn (*Brassica napus*) family of SINE retroposons. *Plant Mol Biol*, 32, 869-878.
- Deragon, J.M., Landry, B.S., Pelissier, T., Tutois, S., Tourmente, S. and Picard, G. (1994) An analysis of retroposition in plants based on a family of SINEs from *Brassica napus*. *J Mol Evol*, 39, 378-386.
- Deragon, J.M. and Zhang, X. (2006) Short interspersed elements (SINEs) in plants: origin, classification, and use as phylogenetic markers. *Syst Biol*, 55, 949-956.
- Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D. and Fobert, P.R. (2003) The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell*, 15, 2181-2191.
- Dever, T.E., Chen, J.J., Barber, G.N., Cigan, A.M., Feng, L., Donahue, T.F., London, I.M., Katze, M.G. and Hinnebusch, A.G. (1993) Mammalian eukaryotic initiation factor 2 alpha kinases functionally substitute for GCN2 protein kinase in the GCN4 translational control mechanism of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 4616-4620.
- Dever, T.E., Feng, L., Wek, R.C., Cigan, A.M., Donahue, T.F. and Hinnebusch, A.G. (1992) Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell*, 68, 585-596.
- Dewannieux, M., Esnault, C. and Heidmann, T. (2003) LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet*, 35, 41-48.
- Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J.M., Jacquard, A., Kilby, N.J. and Murray, J.A. (2003) Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell*, 15, 79-92.
- Dey, M., Cao, C., Dar, A.C., Tamura, T., Ozato, K., Sicheri, F. and Dever, T.E. (2005) Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell*, 122, 901-913.
- Di Como, C.J. and Arndt, K.T. (1996) Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev*, 10, 1904-1916.
- Di Stefano, L., Jensen, M.R. and Helin, K. (2003) E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *Embo J*, 22, 6289-6298.
- Ditzer, A. and Bartels, D. (2006) Identification of a dehydration and ABA-responsive promoter regulon and isolation of corresponding DNA binding proteins for the group 4 LEA gene CpC2 from *C. plantagineum*. *Plant Mol Biol*, 61, 643-663.
- Doerks, T., Copley, R.R., Schultz, J., Ponting, C.P. and Bork, P. (2002) Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *Genome Res*, 12, 47-56.
- Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J. and Hinnebusch, A.G. (2000) Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell*, 6, 269-279.
- Dong, Q., Roy, L., Freeling, M., Walbot, V. and Brendel, V. (2003) ZmDB, an integrated database for maize genome research. *Nucleic Acids Res*, 31, 244-247.
- Donze, O. and Picard, D. (1999) Hsp90 binds and regulates Gcn2, the ligand-inducible kinase of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 [corrected]. *Mol Cell Biol*, 19, 8422-8432.
- Doonan, J. and Hunt, T. (1996) Cell cycle. Why don't plants get cancer? *Nature*, 380, 481-482.

- Doostzadeh-Cizeron, J., Evans, R., Yin, S. and Goodrich, D.W. (1999) Apoptosis induced by the nuclear death domain protein p84N5 is inhibited by association with Rb protein. *Mol Biol Cell*, 10, 3251-3261.
- Dowdy, S.F., Hinds, P.W., Louie, K., Reed, S.I., Arnold, A. and Weinberg, R.A. (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*, 73, 499-511.
- Dunaief, J.L., Strober, B.E., Guha, S., Khavari, P.A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G.R. and Goff, S.P. (1994) The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell*, 79, 119-130.
- Duncan, R.F., Cavener, D.R. and Qu, S. (1995) Heat shock effects on phosphorylation of protein synthesis initiation factor proteins eIF-4E and eIF-2 alpha in *Drosophila*. *Biochemistry*, 34, 2985-2997.
- Durfee, T., Feiler, H.S. and Grissem, W. (2000) Retinoblastoma-related proteins in plants: homologues or orthologues of their metazoan counterparts? *Plant Mol Biol*, 43, 635-642.
- Durfee, T., Mancini, M.A., Jones, D., Elledge, S.J. and Lee, W.H. (1994) The amino-terminal region of the retinoblastoma gene product binds a novel nuclear matrix protein that co-localizes to centers for RNA processing. *J Cell Biol*, 127, 609-622.
- Dyer, W.E., Henstrand, J.M., Handa, A.K. and Herrmann, K.M. (1989) Wounding induces the first enzyme of the shikimate pathway in Solanaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7370-7373.
- Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K. and Harlow, E. (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243, 934-937.
- Ebel, C., Mariconti, L. and Grissem, W. (2004) Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature*, 429, 776-780.
- Egeland, D.B., Sturtevant, A.P. and Schuler, M.A. (1989) Molecular analysis of dicot and monocot small nuclear RNA populations. *Plant Cell*, 1, 633-643.
- Ellgaard, L., Molinari, M. and Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, 286, 1882-1888.
- Endoh, H. and Okada, N. (1986) Total DNA transcription in vitro: a procedure to detect highly repetitive and transcribable sequences with tRNA-like structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 251-255.
- Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K. and Karin, M. (1994) The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell*, 77, 381-390.
- Erickson, F.L., Harding, L.D., Dorris, D.R. and Hannig, E.M. (1997) Functional analysis of homologs of translation initiation factor 2gamma in yeast. *Mol Gen Genet*, 253, 711-719.
- Ernst, H., Duncan, R.F. and Hershey, J.W. (1987) Cloning and sequencing of complementary DNAs encoding the alpha-subunit of translational initiation factor eIF-2. Characterization of the protein and its messenger RNA. *J Biol Chem*, 262, 1206-1212.
- Esnault, C., Maestre, J. and Heidmann, T. (2000) Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet*, 24, 363-367.
- Espinoza, C.A., Allen, T.A., Hieb, A.R., Kugel, J.F. and Goodrich, J.A. (2004) B2 RNA binds directly to RNA polymerase II to repress transcript synthesis. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 822-829.

- Espinoza, C.A., Goodrich, J.A. and Kugel, J.F. (2007) Characterization of the structure, function, and mechanism of B2 RNA, an ncRNA repressor of RNA polymerase II transcription. *RNA*, 13, 583-596.
- Ewen, M.E., Sluss, H.K., Sherr, C.J., Matsushime, H., Kato, J. and Livingston, D.M. (1993) Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell*, 73, 487-497.
- Ewen, M.E., Xing, Y.G., Lawrence, J.B. and Livingston, D.M. (1991) Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell*, 66, 1155-1164.
- Farkas, I., Dombradi, V., Miskei, M., Szabados, L. and Koncz, C. (2007) Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci*, 12, 169-176.
- Farrell, P.J., Balkow, K., Hunt, T., Jackson, R.J. and Trachsel, H. (1977) Phosphorylation of initiation factor eIF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis. *Cell*, 11, 187-200.
- Ferreira, R., Magnaghi-Jaulin, L., Robin, P., Harel-Bellan, A. and Trouche, D. (1998) The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10493-10498.
- Ferreira, R., Naguibneva, I., Mathieu, M., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Pritchard, L.L. and Harel-Bellan, A. (2001) Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep*, 2, 794-799.
- Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, J.S. and Brodsky, J.L. (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet*, 35, 149-191.
- Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, W.G., Jr., Livingston, D.M., Orkin, S.H. and Greenberg, M.E. (1996) E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell*, 85, 549-561.
- Filmus, J., Robles, A.I., Shi, W., Wong, M.J., Colombo, L.L. and Conti, C.J. (1994) Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene*, 9, 3627-3633.
- Florentz, C., Kern, D. and Giege, R. (1990) Stimulatory effect of ammonium sulfate at high concentrations on the aminoacylation of tRNA and tRNA-like molecules. *FEBS Lett*, 261, 335-338.
- Fobert, P.R., Gaudin, V., Lunness, P., Coen, E.S. and Doonan, J.H. (1996) Distinct classes of cdc2-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell*, 8, 1465-1476.
- Fornace, A.J., Jr. and Mitchell, J.B. (1986) Induction of B2 RNA polymerase III transcription by heat shock: enrichment for heat shock induced sequences in rodent cells by hybridization subtraction. *Nucleic Acids Res*, 14, 5793-5811.
- Francis, D. (2007) The plant cell cycle--15 years on. *New Phytol*, 174, 261-278.
- Franz, A., Makkouk, K.M. and Vetten, H.J. (1995) Faba bean necrotic yellows virus naturally infects Phaseolus bean and cowpea in the coastal area of Syria. *Journal of Phytopathology* 143, 319-320.
- Franz, A., Makkouk, K.M. and Vetten, H.J. (1997) Host range of faba bean necrotic yellows virus and potential yield loss in infected faba bean. *Phytopathologia Mediterranea*, 36, 94-103.
- Franz, A., Makkouk, K.M. and Vetten, H.J. (1998) Acquisition, Retention and Transmission of Faba Bean Necrotic Yellows Virus by Two of its Aphid Vectors, Aphis craccivora (Koch) and Acyrthosiphon pisum (Harris). In *Journal of Phytopathology*, pp. 347-355.

- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M. and Dryja, T.P. (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323, 643-646.
- Fung, Y.K., Murphree, A.L., T'Ang, A., Qian, J., Hinrichs, S.H. and Benedict, W.F. (1987) Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*, 236, 1657-1661.
- Galbraith, D.W., Harkins, K.R. and Knapp, S. (1991) Systemic Endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 96, 985-989.
- Gale, M., Jr., Tan, S.L., Wambach, M. and Katze, M.G. (1996) Interaction of the interferon-induced PKR protein kinase with inhibitory proteins P58IPK and vaccinia virus K3L is mediated by unique domains: implications for kinase regulation. *Mol Cell Biol*, 16, 4172-4181.
- Garcia-Barrio, M., Dong, J., Cherkasova, V.A., Zhang, X., Zhang, F., Ufano, S., Lai, R., Qin, J. and Hinnebusch, A.G. (2002) Serine 577 is phosphorylated and negatively affects the tRNA binding and eIF2alpha kinase activities of GCN2. *J Biol Chem*, 277, 30675-30683.
- Garcia-Barrio, M., Dong, J., Ufano, S. and Hinnebusch, A.G. (2000) Association of GCN1-GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2alpha kinase GCN2 is required for GCN2 activation. *EMBO J*, 19, 1887-1899.
- Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Roeder, R.G. and Chua, N.H. (1990) *Arabidopsis thaliana* contains two genes for TFIID. *Nature*, 346, 390-394.
- Gaspar, N.J., Kinzy, T.G., Scherer, B.J., Humbelin, M., Hershey, J.W. and Merrick, W.C. (1994) Translation initiation factor eIF-2. Cloning and expression of the human cDNA encoding the gamma-subunit. *J Biol Chem*, 269, 3415-3422.
- Gaudino, R.J. and Pikaard, C.S. (1997) Cytokinin induction of RNA polymerase I transcription in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 272, 6799-6804.
- Geiduschek, E.P. and Kassavetis, G.A. (2001) The RNA polymerase III transcription apparatus. *J Mol Biol*, 310, 1-26.
- Geng, Y., Eaton, E.N., Picon, M., Roberts, J.M., Lundberg, A.S., Gifford, A., Sardet, C. and Weinberg, R.A. (1996) Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*, 12, 1173-1180.
- Ghosh, M.K. and Harter, M.L. (2003) A viral mechanism for remodeling chromatin structure in G0 cells. *Mol Cell*, 12, 255-260.
- Gil, J., Esteban, M. and Roth, D. (2000) In vivo regulation of protein synthesis by phosphorylation of the alpha subunit of wheat eukaryotic initiation factor 2. *Biochemistry*, 39, 7521-7530.
- Gingras, A.C., Raught, B. and Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, 68, 913-963.
- Girling, R., Partridge, J.F., Bandara, L.R., Burden, N., Totty, N.F., Hsuan, J.J. and La Thangue, N.B. (1993) A new component of the transcription factor DRTF1/E2F. *Nature*, 365, 468.
- Gjymishka, A., Palii, S.S., Shan, J. and Kilberg, M.S. (2008) Despite increased ATF4 binding at the C/EBP-ATF composite site following activation of the unfolded protein response, system A transporter 2 (SNAT2) transcription activity is repressed in HepG2 cells. *J Biol Chem*.
- Goossens, A., Dever, T.E., Pascual-Ahuir, A. and Serrano, R. (2001) The protein kinase Gcn2p mediates sodium toxicity in yeast. *J Biol Chem*, 276, 30753-30760.

- Gordon-Kamm, W., Dilkes, B.P., Lowe, K., Hoerster, G., Sun, X., Ross, M., Church, L., Bunde, C., Farrell, J., Hill, P., Maddock, S., Snyder, J., Sykes, L., Li, Z., Woo, Y.M., Bidney, D. and Larkins, B.A. (2002) Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11975-11980.
- Grafi, G., Burnett, R.J., Helentjaris, T., Larkins, B.A., DeCaprio, J.A., Sellers, W.R. and Kaelin, W.G., Jr. (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 8962-8967.
- Grant, C.M. and Hinnebusch, A.G. (1994) Effect of sequence context at stop codons on efficiency of reinitiation in GCN4 translational control. *Mol Cell Biol*, 14, 606-618.
- Gray-Bablin, J., Zalvide, J., Fox, M.P., Knickerbocker, C.J., DeCaprio, J.A. and Keyomarsi, K. (1996) Cyclin E, a redundant cyclin in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 15215-15220.
- Guyer, D., Patton, D. and Ward, E. (1995) Evidence for cross-pathway regulation of metabolic gene expression in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4997-5000.
- Hai, T. and Curran, T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3720-3724.
- Han, A.P., Yu, C., Lu, L., Fujiwara, Y., Browne, C., Chin, G., Fleming, M., Leboulch, P., Orkin, S.H. and Chen, J.J. (2001) Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J*, 20, 6909-6918.
- Haneda, M., Xiao, H., Hasegawa, T., Kimura, Y., Nakashima, I. and Isobe, K. (2004) Regulation of mouse GADD34 gene transcription after DNA damaging agent methylmethane sulfonate. *Gene*, 336, 139-146.
- Hanks, S.K. and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*, 9, 576-596.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241, 42-52.
- Hannan, K.M., Hannan, R.D., Smith, S.D., Jefferson, L.S., Lun, M. and Rothblum, L.I. (2000) Rb and p130 regulate RNA polymerase I transcription: Rb disrupts the interaction between UBF and SL-1. *Oncogene*, 19, 4988-4999.
- Hannig, E.M., Cigan, A.M., Freeman, B.A. and Kinzy, T.G. (1993) GCD11, a negative regulator of GCN4 expression, encodes the gamma subunit of eIF-2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 13, 506-520.
- Hanson, J., Hanssen, M., Wiese, A., Hendriks, M.M. and Smeekens, S. (2008) The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2. *Plant J*, 53, 935-949.
- Harbour, J.W. and Dean, D.C. (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, 14, 2393-2409.
- Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A. and Dean, D.C. (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, 98, 859-869.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D. (2000a) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*, 6, 1099-1108.

- Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D. and Ron, D. (2001) Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell*, 7, 1153-1163.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. and Ron, D. (2000b) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*, 5, 897-904.
- Harding, H.P., Zhang, Y. and Ron, D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397, 271-274.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M. and Ron, D. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 11, 619-633.
- Harding, R.M., Burns, T.M. and Dale, J.L. (1991) Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single-stranded DNA. *J Gen Virol*, 72 (Pt 2), 225-230.
- Hardy, S. and Shenk, T. (1989) E2F from adenovirus-infected cells binds cooperatively to DNA containing two properly oriented and spaced recognition sites. *Mol Cell Biol*, 9, 4495-4506.
- Harlow, E., Whyte, P., Franza, B.R., Jr. and Schley, C. (1986) Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides. *Mol Cell Biol*, 6, 1579-1589.
- Harris, D.M., Myrick, T.L. and Rundle, S.J. (1999) The Arabidopsis homolog of yeast TAP42 and mammalian alpha4 binds to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A and is induced by chilling. *Plant Physiol*, 121, 609-617.
- Hateboer, G., Kerkhoven, R.M., Shvarts, A., Bernards, R. and Beijersbergen, R.L. (1996) Degradation of E2F by the ubiquitin-proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins. *Genes Dev*, 10, 2960-2970.
- Hay, N. and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 18, 1926-1945.
- He, Y., Armanious, M.K., Thomas, M.J. and Cress, W.D. (2000) Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region. *Oncogene*, 19, 3422-3433.
- Healy, J.M., Menges, M., Doonan, J.H. and Murray, J.A. (2001) The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J Biol Chem*, 276, 7041-7047.
- Helin, K., Wu, C.L., Fattaey, A.R., Lees, J.A., Dynlacht, B.D., Ngwu, C. and Harlow, E. (1993) Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev*, 7, 1850-1861.
- Hemerly, A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Inze, D. and Ferreira, P. (1992) Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 3295-3299.
- Hernandez, N. (1993) TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev*, 7, 1291-1308.
- Herrera, R.E., Sah, V.P., Williams, B.O., Makela, T.P., Weinberg, R.A. and Jacks, T. (1996) Altered cell cycle kinetics, gene expression, and G1 restriction point regulation in Rb-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 16, 2402-2407.

- Hewes, R.S., Schaefer, A.M. and Taghert, P.H. (2000) The cryptocephal gene (ATF4) encodes multiple basic-leucine zipper proteins controlling molting and metamorphosis in *Drosophila*. *Genetics*, 155, 1711-1723.
- Hiddinga, H.J., Crum, C.J., Hu, J. and Roth, D.A. (1988) Viroid-induced phosphorylation of a host protein related to a dsRNA-dependent protein kinase. *Science*, 241, 451-453.
- Hiebert, S.W., Lipp, M. and Nevins, J.R. (1989) E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 3594-3598.
- Hill, D.E., Hope, I.A., Macke, J.P. and Struhl, K. (1986) Saturation mutagenesis of the yeast his3 regulatory site: requirements for transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein. *Science*, 234, 451-457.
- Hinds, P.W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S.I. and Weinberg, R.A. (1992) Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*, 70, 993-1006.
- Hinnebusch, A.G. (1984) Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 6442-6446.
- Hinnebusch, A.G. (1988) Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, 52, 248-273.
- Hinnebusch, A.G. and Fink, G.R. (1983) Repeated DNA sequences upstream from HIS1 also occur at several other co-regulated genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 258, 5238-5247.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K. and Fukuhara, T. (2005) Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 57, 173-188.
- Hirsch, H.A., Jawdekar, G.W., Lee, K.A., Gu, L. and Henry, R.W. (2004) Distinct mechanisms for repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol*, 24, 5989-5999.
- Ho, M.S., Tsai, P.I. and Chien, C.T. (2006) F-box proteins: the key to protein degradation. *J Biomed Sci*, 13, 181-191.
- Hope, I.A. and Struhl, K. (1987) GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. *EMBO J*, 6, 2781-2784.
- Horton, L.E., Qian, Y. and Templeton, D.J. (1995) G1 cyclins control the retinoblastoma gene product growth regulation activity via upstream mechanisms. *Cell Growth Differ*, 6, 395-407.
- Howe, G.A. and Jander, G. (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol*, 59, 41-66.
- Hu, Q.J., Dyson, N. and Harlow, E. (1990) The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T antigen are common sites for mutations. *Embo J*, 9, 1147-1155.
- Huang, S., Shin, E., Sheppard, K.A., Chokroverty, L., Shan, B., Qian, Y.W., Lee, E.Y. and Yee, A.S. (1992) The retinoblastoma protein region required for interaction with the E2F transcription factor includes the T/E1A binding and carboxy-terminal sequences. *DNA Cell Biol*, 11, 539-548.
- Huang, S., Wang, N.P., Tseng, B.Y., Lee, W.H. and Lee, E.H. (1990) Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen. *Embo J*, 9, 1815-1822.

- Huang, Y. and Maraia, R.J. (2001) Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic Acids Res*, 29, 2675-2690.
- Hughes, T.R., Marton, M.J., Jones, A.R., Roberts, C.J., Stoughton, R., Armour, C.D., Bennett, H.A., Coffey, E., Dai, H., He, Y.D., Kidd, M.J., King, A.M., Meyer, M.R., Slade, D., Lum, P.Y., Stepaniants, S.B., Shoemaker, D.D., Gachotte, D., Chakraborty, K., Simon, J., Bard, M. and Friend, S.H. (2000) Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell*, 102, 109-126.
- Hunter, T., Hunt, T., Jackson, R.J. and Robertson, H.D. (1975) The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J Biol Chem*, 250, 409-417.
- Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makker, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., Bannister, A.J., Kouzarides, T., Gutierrez, C., Doonan, J.H. and Murray, J.A. (1998) The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol*, 37, 155-169.
- Huse, M. and Kuriyan, J. (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*, 109, 275-282.
- Iaquinta, P.J. and Lees, J.A. (2007) Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 649-657.
- Imai, K.K., Ohashi, Y., Tsuge, T., Yoshizumi, T., Matsui, M., Oka, A. and Aoyama, T. (2006) The A-type cyclin CYCA2;3 is a key regulator of ploidy levels in Arabidopsis endoreduplication. *Plant Cell*, 18, 382-396.
- Ito, M., Iwase, M., Kodama, H., Lavis, P., Komamine, A., Nishihama, R., Machida, Y. and Watanabe, A. (1998) A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *Plant Cell*, 10, 331-341.
- Jacinto, E., Guo, B., Arndt, K.T., Schmelzle, T. and Hall, M.N. (2001) TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol Cell*, 8, 1017-1026.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T. and Parcy, F. (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*, 7, 106-111.
- Jang, K.L. and Latchman, D.S. (1989) HSV infection induces increased transcription of Alu repeated sequences by RNA polymerase III. *FEBS Lett*, 258, 255-258.
- Jelinek, W.R., Toomey, T.P., Leinwand, L., Duncan, C.H., Biro, P.A., Choudary, P.V., Weissman, S.M., Rubin, C.M., Houck, C.M., Deininger, P.L. and Schmid, C.W. (1980) Ubiquitous, interspersed repeated sequences in mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 1398-1402.
- Jia, M.H., Larossa, R.A., Lee, J.M., Rafalski, A., Deroose, E., Gonye, G. and Xue, Z. (2000) Global expression profiling of yeast treated with an inhibitor of amino acid biosynthesis, sulfometuron methyl. *Physiol Genomics*, 3, 83-92.
- Jiang, H.Y., Wek, S.A., McGrath, B.C., Lu, D., Hai, T., Harding, H.P., Wang, X., Ron, D., Cavener, D.R. and Wek, R.C. (2004) Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol*, 24, 1365-1377.
- Joaquin, M. and Watson, R.J. (2003) Cell cycle regulation by the B-Myb transcription factor. *Cell Mol Life Sci*, 60, 2389-2401.
- John, P.C. and Qi, R. (2008) Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth. *Trends Plant Sci*, 13, 121-127.

- Joubes, J. and Chevalier, C. (2000) Endoreduplication in higher plants. *Plant Mol Biol*, 43, 735-745.
- Joubes, J., Phan, T.H., Just, D., Rothan, C., Bergounioux, C., Raymond, P. and Chevalier, C. (1999) Molecular and biochemical characterization of the involvement of cyclin-dependent kinase A during the early development of tomato fruit. *Plant Physiol*, 121, 857-869.
- Jurka, J. (1997) Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1872-1877.
- Kaelin, W.G., Jr., Ewen, M.E. and Livingston, D.M. (1990) Definition of the minimal simian virus 40 large T antigen- and adenovirus E1A-binding domain in the retinoblastoma gene product. *Mol Cell Biol*, 10, 3761-3769.
- Kajikawa, M. and Okada, N. (2002) LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence. *Cell*, 111, 433-444.
- Kapitonov, V.V. and Jurka, J. (2003) A novel class of SINE elements derived from 5S rRNA. *Mol Biol Evol*, 20, 694-702.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S.W., Ewen, M.E. and Sherr, C.J. (1993) Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev*, 7, 331-342.
- Katul, L., Maiss, E., Morozov, S.Y. and Vetten, H.J. (1997) Analysis of six DNA components of the faba bean necrotic yellows virus genome and their structural affinity to related plant virus genomes. *Virology*, 233, 247-259.
- Katul, L., Maiss, E. and Vetten, H.J. (1995) Sequence analysis of a faba bean necrotic yellows virus DNA component containing a putative replicase gene. *J Gen Virol*, 76 (Pt 2), 475-479.
- Katul, L., Timchenko, T., Gronenborn, B. and Vetten, H.J. (1998) Ten distinct circular ssDNA components, four of which encode putative replication-associated proteins, are associated with the faba bean necrotic yellows virus genome. *J Gen Virol*, 79 (Pt 12), 3101-3109.
- Kawaguchi, R. and Bailey-Serres, J. (2002) Regulation of translational initiation in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 5, 460-465.
- Kelly, B.L., Wolfe, K.G. and Roberts, J.M. (1998) Identification of a substrate-targeting domain in cyclin E necessary for phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2535-2540.
- Kido, Y., Aono, M., Yamaki, T., Matsumoto, K., Murata, S., Saneyoshi, M. and Okada, N. (1991) Shaping and reshaping of salmonid genomes by amplification of tRNA-derived retroposons during evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 2326-2330.
- Kim, H.Y. and Cho, Y. (1997) Structural similarity between the pocket region of retinoblastoma tumour suppressor and the cyclin-box. *Nat Struct Biol*, 4, 390-395.
- Kimball, S.R., Heinzinger, N.K., Horetsky, R.L. and Jefferson, L.S. (1998) Identification of interprotein interactions between the subunits of eukaryotic initiation factors eIF2 and eIF2B. *J Biol Chem*, 273, 3039-3044.
- Kimura, R.H., Choudary, P.V. and Schmid, C.W. (1999) Silk worm Bm1 SINE RNA increases following cellular insults. *Nucleic Acids Res*, 27, 3380-3387.
- Klein, J. and Grummt, I. (1999) Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6096-6101.
- Kleinberger, T. and Shenk, T. (1991) A protein kinase is present in a complex with adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 11143-11147.

- Koff, A., Cross, F., Fisher, A., Schumacher, J., Leguellec, K., Philippe, M. and Roberts, J.M. (1991) Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell*, 66, 1217-1228.
- Kong, L.J., Orozco, B.M., Roe, J.L., Nagar, S., Ou, S., Feiler, H.S., Durfee, T., Miller, A.B., Grussem, W., Robertson, D. and Hanley-Bowdoin, L. (2000) A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J*, 19, 3485-3495.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, 54, 631-664.
- Kostura, M. and Mathews, M.B. (1989) Purification and activation of the double-stranded RNA-dependent eIF-2 kinase DAI. *Mol Cell Biol*, 9, 1576-1586.
- Kosugi, S. and Ohashi, Y. (2002) Interaction of the Arabidopsis E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiol*, 128, 833-843.
- Kowles, R.V. and Phillips, R.L. (1985) DNA amplification patterns in maize endosperm nuclei during kernel development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 7010-7014.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J. and Sambrook, J. (1988) The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, 332, 462-464.
- Kramer, G., Cimadevilla, J.M. and Hardesty, B. (1976) Specificity of the protein kinase activity associated with the hemin-controlled repressor of rabbit reticulocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 3078-3082.
- Kramerov, D.A., Grigoryan, A.A., Ryskov, A.P. and Georgiev, G.P. (1979) Long double-stranded sequences (dsRNA-B) of nuclear pre-mRNA consist of a few highly abundant classes of sequences: evidence from DNA cloning experiments. *Nucleic Acids Res*, 6, 697-713.
- Kramerov, D.A., Lekakh, I.V., Samarina, O.P. and Ryskov, A.P. (1982) The sequences homologous to major interspersed repeats B1 and B2 of mouse genome are present in mRNA and small cytoplasmic poly(A) + RNA. *Nucleic Acids Res*, 10, 7477-7491.
- Kramerov, D.A. and Vassetzky, N.S. (2005) Short retroposons in eukaryotic genomes. *Int Rev Cytol*, 247, 165-221.
- Krek, W., Livingston, D.M. and Shirodkar, S. (1993) Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members. *Science*, 262, 1557-1560.
- Krishnamoorthy, T., Pavitt, G.D., Zhang, F., Dever, T.E. and Hinnebusch, A.G. (2001) Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol Cell Biol*, 21, 5018-5030.
- Kubota, H., Obata, T., Ota, K., Sasaki, T. and Ito, T. (2003) Rapamycin-induced translational derepression of GCN4 mRNA involves a novel mechanism for activation of the eIF2 alpha kinase GCN2. *J Biol Chem*, 278, 20457-20460.
- Kubota, H., Sakaki, Y. and Ito, T. (2000) GI domain-mediated association of the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase GCN2 with its activator GCN1 is required for general amino acid control in budding yeast. *J Biol Chem*, 275, 20243-20246.
- Labuda, T., Lando, P., Bjorkdahl, O., Kalland, T., Vessella, R., Hedlund, G., Eriksson, H., Sjogren, H.O. and Dohlsten, M. (1995) A novel co-stimulatory T cell antigen co-expressed on renal cell carcinoma. *Int Immunol*, 7, 1425-1432.

- Lam, E.W. and Watson, R.J. (1993) An E2F-binding site mediates cell-cycle regulated repression of mouse B-myb transcription. *Embo J*, 12, 2705-2713.
- Initial sequencing and analysis of the human genome. (2001) *Nature*, 409, 860-921.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 240, 1759-1764.
- Langland, J.O., Jin, S., Jacobs, B.L. and Roth, D.A. (1995) Identification of a plant-encoded analog of PKR, the mammalian double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Plant Physiol*, 108, 1259-1267.
- Langland, J.O., Langland, L., Zeman, C., Saha, D. and Roth, D.A. (1997) Developmental regulation of a plant encoded inhibitor of eukaryotic initiation factor 2 alpha phosphorylation. *Plant J*, 12, 393-400.
- Langland, J.O., Langland, L.A., Browning, K.S. and Roth, D.A. (1996) Phosphorylation of plant eukaryotic initiation factor-2 by the plant-encoded double-stranded RNA-dependent protein kinase, pPKR, and inhibition of protein synthesis in vitro. *J Biol Chem*, 271, 4539-4544.
- Larminie, C.G., Cairns, C.A., Mital, R., Martin, K., Kouzarides, T., Jackson, S.P. and White, R.J. (1997) Mechanistic analysis of RNA polymerase III regulation by the retinoblastoma protein. *Embo J*, 16, 2061-2071.
- Le, H., Browning, K.S. and Gallie, D.R. (1998) The phosphorylation state of the wheat translation initiation factors eIF4B, eIF4A, and eIF2 is differentially regulated during seed development and germination. *J Biol Chem*, 273, 20084-20089.
- Learned, R.M., Learned, T.K., Haltiner, M.M. and Tjian, R.T. (1986) Human rRNA transcription is modulated by the coordinate binding of two factors to an upstream control element. *Cell*, 45, 847-857.
- Ledl, A., Schmidt, D. and Muller, S. (2005) Viral oncoproteins E1A and E7 and cellular LxCxE proteins repress SUMO modification of the retinoblastoma tumor suppressor. *Oncogene*, 24, 3810-3818.
- Lee, E.Y., To, H., Shew, J.Y., Bookstein, R., Scully, P. and Lee, W.H. (1988) Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science*, 241, 218-221.
- Lee, H.H., Chiang, W.H., Chiang, S.H., Liu, Y.C., Hwang, J. and Ng, S.Y. (1995) Regulation of cyclin D1, DNA topoisomerase I, and proliferating cell nuclear antigen promoters during the cell cycle. *Gene Expr*, 4, 95-109.
- Lee, J.O., Russo, A.A. and Pavletich, N.P. (1998) Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature*, 391, 859-865.
- Lee, S.J., Lee, M.Y., Yi, S.Y., Oh, S.K., Choi, S.H., Her, N.H., Choi, D., Min, B.W., Yang, S.G. and Harn, C.H. (2002) PPI1: a novel pathogen-induced basic region-leucine zipper (bZIP) transcription factor from pepper. *Mol Plant Microbe Interact*, 15, 540-548.
- Lees, J.A., Buchkovich, K.J., Marshak, D.R., Anderson, C.W. and Harlow, E. (1991) The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. *Embo J*, 10, 4279-4290.
- Legon, S., Jackson, R.J. and Hunt, T. (1973) Control of protein synthesis in reticulocyte lysates by haemin. *Nat New Biol*, 241, 150-152.
- Lei, M. and Tye, B.K. (2001) Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci*, 114, 1447-1454.

- Lemaire, P.A., Lary, J. and Cole, J.L. (2005) Mechanism of PKR activation: dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA. *J Mol Biol*, 345, 81-90.
- Lendvai, A., Pettko-Szandtner, A., Csordas-Toth, E., Miskolczi, P., Horvath, G.V., Gyorgyey, J. and Dudits, D. (2007) Dicot and monocot plants differ in retinoblastoma-related protein subfamilies. *J Exp Bot*, 58, 1663-1675.
- Lenoir, A., Lavie, L., Prieto, J.L., Goubely, C., Cote, J.C., Pelissier, T. and Deragon, J.M. (2001) The evolutionary origin and genomic organization of SINEs in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol*, 18, 2315-2322.
- Leone, G., DeGregori, J., Yan, Z., Jakoi, L., Ishida, S., Williams, R.S. and Nevins, J.R. (1998) E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev*, 12, 2120-2130.
- Levin, D., Ranu, R.S., Ernst, V. and London, I.M. (1976) Regulation of protein synthesis in reticulocyte lysates: phosphorylation of methionyl-tRNA^f binding factor by protein kinase activity of translational inhibitor isolated from hemedeficient lysates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 3112-3116.
- Lew, D.J., Dulic, V. and Reed, S.I. (1991) Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell*, 66, 1197-1206.
- Li, T., Spearow, J., Rubin, C.M. and Schmid, C.W. (1999) Physiological stresses increase mouse short interspersed element (SINE) RNA expression in vivo. *Gene*, 239, 367-372.
- Li, T.H. and Schmid, C.W. (2001) Differential stress induction of individual Alu loci: implications for transcription and retrotransposition. *Gene*, 276, 135-141.
- Li, Y., Graham, C., Lacy, S., Duncan, A.M. and Whyte, P. (1993) The adenovirus E1A-associated 130-kD protein is encoded by a member of the retinoblastoma gene family and physically interacts with cyclins A and E. *Genes Dev*, 7, 2366-2377.
- Lin, B.T., Gruenwald, S., Morla, A.O., Lee, W.H. and Wang, J.Y. (1991) Retinoblastoma cancer suppressor gene product is a substrate of the cell cycle regulator cdc2 kinase. *Embo J*, 10, 857-864.
- Lindeman, G.J., Dagnino, L., Gaubatz, S., Xu, Y., Bronson, R.T., Warren, H.B. and Livingston, D.M. (1998) A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Genes Dev*, 12, 1092-1098.
- Liu, C.Y., Schroder, M. and Kaufman, R.J. (2000) Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 275, 24881-24885.
- Liu, L., Saunders, K., Thomas, C.L., Davies, J.W. and Stanley, J. (1999) Bean yellow dwarf virus RepA, but not rep, binds to maize retinoblastoma protein, and the virus tolerates mutations in the consensus binding motif. *Virology*, 256, 270-279.
- Liu, W.M., Chu, W.M., Choudary, P.V. and Schmid, C.W. (1995) Cell stress and translational inhibitors transiently increase the abundance of mammalian SINE transcripts. *Nucleic Acids Res*, 23, 1758-1765.
- Lobo, M.V., Alonso, F.J., Rodriguez, S., Alcazar, A., Martin, E., Munoz, F., R, G.S., Salinas, M. and Fando, J.L. (1997) Localization of eukaryotic initiation factor 2 in neuron primary cultures and established cell lines. *Histochem J*, 29, 453-468.
- Lobo, S.M., Lister, J., Sullivan, M.L. and Hernandez, N. (1991) The cloned RNA polymerase II transcription factor IID selects RNA polymerase III to transcribe the human U6 gene in vitro. *Genes Dev*, 5, 1477-1489.
- Lopez, A.B., Wang, C., Huang, C.C., Yaman, I., Li, Y., Chakravarty, K., Johnson, P.F., Chiang, C.M., Snider, M.D., Wek, R.C. and Hatzoglou, M. (2007) A feedback

- transcriptional mechanism controls the level of the arginine/lysine transporter cat-1 during amino acid starvation. *Biochem J*, 402, 163-173.
- Lu, L., Han, A.P. and Chen, J.J. (2001) Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Mol Cell Biol*, 21, 7971-7980.
- Lu, P.D., Harding, H.P. and Ron, D. (2004a) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol*, 167, 27-33.
- Lu, P.D., Jousse, C., Marciniak, S.J., Zhang, Y., Novoa, I., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ron, D. and Harding, H.P. (2004b) Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2. *EMBO J*, 23, 169-179.
- Ludlow, J.W., DeCaprio, J.A., Huang, C.M., Lee, W.H., Paucha, E. and Livingston, D.M. (1989) SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell*, 56, 57-65.
- Ludlow, J.W., Glendening, C.L., Livingston, D.M. and DeCaprio, J.A. (1993) Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, 13, 367-372.
- Lukacs, G.L., Mohamed, A., Kartner, N., Chang, X.B., Riordan, J.R. and Grinstein, S. (1994) Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J*, 13, 6076-6086.
- Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J. and Helin, K. (1996) Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol*, 16, 1047-1057.
- Luo, R.X., Postigo, A.A. and Dean, D.C. (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*, 92, 463-473.
- Luo, Z., Freitag, M. and Sachs, M.S. (1995) Translational regulation in response to changes in amino acid availability in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol*, 15, 5235-5245.
- Ma, K., Vatter, K.M. and Wek, R.C. (2002a) Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 277, 18728-18735.
- Ma, Y., Brewer, J.W., Diehl, J.A. and Hendershot, L.M. (2002b) Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol*, 318, 1351-1365.
- Ma, Y. and Hendershot, L.M. (2003) Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 278, 34864-34873.
- Macaluso, M., Cinti, C., Russo, G., Russo, A. and Giordano, A. (2003) pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-p300 and pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-DNMT1 multimolecular complexes mediate the transcription of estrogen receptor- α in breast cancer. *Oncogene*, 22, 3511-3517.
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J.P., Troalen, F., Trouche, D. and Harel-Bellan, A. (1998) Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*, 391, 601-605.
- Magyar, Z., Atanassova, A., De Veylder, L., Rombauts, S. and Inze, D. (2000) Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, 486, 79-87.

- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bako, L., Inze, D. and Bogre, L. (2005) The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell*, 17, 2527-2541.
- Mahfouz, M.M., Kim, S., Delauney, A.J. and Verma, D.P. (2006) Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell*, 18, 477-490.
- Maiti, B., Li, J., de Bruin, A., Gordon, F., Timmers, C., Opavsky, R., Patil, K., Tuttle, J., Cleghorn, W. and Leone, G. (2005) Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem*, 280, 18211-18220.
- Makalowski, W., Mitchell, G.A. and Labuda, D. (1994) Alu sequences in the coding regions of mRNA: a source of protein variability. *Trends Genet*, 10, 188-193.
- Makkouk, K.M., Rizkallah, L., Madkour, M., El-Sherbeeney, M., Kumari, and S. G., A., A. W. & Solh, M. B. (1994) Survey of faba bean (*Vicia faba* L.) for viruses in Egypt. *Phytopathologia Mediterranea*, 33, 207-211.
- Maraia, R.J., Driscoll, C.T., Bilyeu, T., Hsu, K. and Darlington, G.J. (1993) Multiple dispersed loci produce small cytoplasmic Alu RNA. *Mol Cell Biol*, 13, 4233-4241.
- Marbach, I., Licht, R., Frohnmeier, H. and Engelberg, D. (2001) Gcn2 mediates Gcn4 activation in response to glucose stimulation or UV radiation not via GCN4 translation. *J Biol Chem*, 276, 16944-16951.
- Mariconti, L., Pellegrini, B., Cantoni, R., Stevens, R., Bergounioux, C., Cella, R. and Albani, D. (2002) The E2F family of transcription factors from Arabidopsis thaliana. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *J Biol Chem*, 277, 9911-9919.
- Mariner, P.D., Walters, R.D., Espinoza, C.A., Drullinger, L.F., Wagner, S.D., Kugel, J.F. and Goodrich, J.A. (2008) Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. *Mol Cell*, 29, 499-509.
- Martinez-Garcia, J.F., Moyano, E., Alcocer, M.J. and Martin, C. (1998) Two bZIP proteins from Antirrhinum flowers preferentially bind a hybrid C-box/G-box motif and help to define a new sub-family of bZIP transcription factors. *Plant J*, 13, 489-505.
- Marton, M.J., Crouch, D. and Hinnebusch, A.G. (1993) GCN1, a translational activator of GCN4 in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 by protein kinase GCN2. *Mol Cell Biol*, 13, 3541-3556.
- Mascarenhas, C., Edwards-Ingram, L.C., Zeef, L., Shenton, D., Ashe, M.P. and Grant, C.M. (2008) Gcn4 Is Required for the Response to Peroxide Stress in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 19, 2995-3007.
- Mauch-Mani, B. and Mauch, F. (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 8, 409-414.
- Mayol, X., Garriga, J. and Grana, X. (1995) Cell cycle-dependent phosphorylation of the retinoblastoma-related protein p130. *Oncogene*, 11, 801-808.
- Melaragno, J.E., Mehrotra, B. and Coleman, A.W. (1993) Relationship between Endopolyploidy and Cell Size in Epidermal Tissue of Arabidopsis. *Plant Cell*, 5, 1661-1668.
- Mellor, H., Flowers, K.M., Kimball, S.R. and Jefferson, L.S. (1994) Cloning and characterization of cDNA encoding rat hemin-sensitive initiation factor-2 alpha (eIF-2 alpha) kinase. Evidence for multitissue expression. *J Biol Chem*, 269, 10201-10204.

- Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C. and Robaglia, C. (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 6422-6427.
- Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R. and Hovanessian, A.G. (1990) Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell*, 62, 379-390.
- Mittnacht, S. (1998) Control of pRB phosphorylation. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 21-27.
- Mochizuki, K., Umeda, M., Ohtsubo, H. and Ohtsubo, E. (1992) Characterization of a plant SINE, p-SINE1, in rice genomes. *Jpn J Genet*, 67, 155-166.
- Moldave, K. (1985) Eukaryotic protein synthesis. *Annu Rev Biochem*, 54, 1109-1149.
- Montagna, M., Santacatterina, M., Torri, A., Menin, C., Zullato, D., Chieco-Bianchi, L. and D'Andrea, E. (1999) Identification of a 3 kb Alu-mediated BRCA1 gene rearrangement in two breast/ovarian cancer families. *Oncogene*, 18, 4160-4165.
- Morkel, M., Wenkel, J., Bannister, A.J., Kouzarides, T. and Hagemeier, C. (1997) An E2F-like repressor of transcription. *Nature*, 390, 567-568.
- Mueller, P.P. and Hinnebusch, A.G. (1986) Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GCN4. *Cell*, 45, 201-207.
- Mulligan, G. and Jacks, T. (1998) The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet*, 14, 223-229.
- Nagar, S., Hanley-Bowdoin, L. and Robertson, D. (2002) Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *Plant Cell*, 14, 2995-3007.
- Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowdoin, L. and Robertson, D. (1995) A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell*, 7, 705-719.
- Nagl, W. (1976) DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature*, 261, 614-615.
- Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H. and Shinmyo, A. (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J*, 18, 243-252.
- Nameki, N., Yoneyama, M., Koshiha, S., Tochio, N., Inoue, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Harada, T., Saito, K., Kobayashi, N., Yabuki, T., Aoki, M., Nunokawa, E., Matsuda, N., Sakagami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Yoshida, M., Hirota, H., Osanai, T., Tanaka, A., Arakawa, T., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Kinoshita, K., Guntert, P., Kigawa, T. and Yokoyama, S. (2004) Solution structure of the RWD domain of the mouse GCN2 protein. *Protein Sci*, 13, 2089-2100.
- Nanduri, S., Carpick, B.W., Yang, Y., Williams, B.R. and Qin, J. (1998) Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation. *EMBO J*, 17, 5458-5465.
- Naranda, T., Sirangelo, I., Fabbri, B.J. and Hershey, J.W. (1995) Mutations in the NKXD consensus element indicate that GTP binds to the gamma-subunit of translation initiation factor eIF2. *FEBS Lett*, 372, 249-252.
- Narasimhan, J., Staschke, K.A. and Wek, R.C. (2004) Dimerization is required for activation of eIF2 kinase Gcn2 in response to diverse environmental stress conditions. *J Biol Chem*, 279, 22820-22832.
- Natarajan, K., Meyer, M.R., Jackson, B.M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A.G. and Marton, M.J. (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol*, 21, 4347-4368.

- Natsoulis, G., Hilger, F. and Fink, G.R. (1986) The HTS1 gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial histidine tRNA synthetases of *S. cerevisiae*. *Cell*, 46, 235-243.
- Nelson, D.A., Krucher, N.A. and Ludlow, J.W. (1997) High molecular weight protein phosphatase type 1 dephosphorylates the retinoblastoma protein. *J Biol Chem*, 272, 4528-4535.
- Nijhawan, A., Jain, M., Tyagi, A.K. and Khurana, J.P. (2008) Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. *Plant Physiol*, 146, 333-350.
- Nishimura, T., Wada, T., Yamamoto, K.T. and Okada, K. (2005) The Arabidopsis STV1 protein, responsible for translation reinitiation, is required for auxin-mediated gynoecium patterning. *Plant Cell*, 17, 2940-2953.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P. and Ron, D. (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol*, 153, 1011-1022.
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H.P. and Ron, D. (2003) Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J*, 22, 1180-1187.
- Oakenfull, E.A., Riou-Khamlichi, C. and Murray, J.A. (2002) Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357, 749-760.
- Ohshima, K. and Okada, N. (1994) Generality of the tRNA origin of short interspersed repetitive elements (SINEs). Characterization of three different tRNA-derived retroposons in the octopus. *J Mol Biol*, 243, 25-37.
- Okada, N. and Hamada, M. (1997) The 3' ends of tRNA-derived SINEs originated from the 3' ends of LINEs: a new example from the bovine genome. *J Mol Evol*, 44 Suppl 1, S52-56.
- Olsen, D.S., Jordan, B., Chen, D., Wek, R.C. and Cavener, D.R. (1998) Isolation of the gene encoding the *Drosophila melanogaster* homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* GCN2 eIF-2 α kinase. *Genetics*, 149, 1495-1509.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H. and Hotamisligil, G.S. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306, 457-461.
- Padyana, A.K., Qiu, H., Roll-Mecak, A., Hinnebusch, A.G. and Burley, S.K. (2005) Structural basis for autoinhibition and mutational activation of eukaryotic initiation factor 2 α protein kinase GCN2. *J Biol Chem*, 280, 29289-29299.
- Palii, S.S., Thiaville, M.M., Pan, Y.X., Zhong, C. and Kilberg, M.S. (2006) Characterization of the amino acid response element within the human sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2) System A transporter gene. *Biochem J*, 395, 517-527.
- Palmer, L.K., Shoemaker, J.L., Baptiste, B.A., Wolfe, D. and Keil, R.L. (2005) Inhibition of translation initiation by volatile anesthetics involves nutrient-sensitive GCN-independent and -dependent processes in yeast. *Mol Biol Cell*, 16, 3727-3739.
- Palmer, L.K., Wolfe, D., Keeley, J.L. and Keil, R.L. (2002) Volatile anesthetics affect nutrient availability in yeast. *Genetics*, 161, 563-574.
- Pan, Y.X., Chen, H., Thiaville, M.M. and Kilberg, M.S. (2007) Activation of the ATF3 gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *Biochem J*, 401, 299-307.

- Panniers, R., Rowlands, A.G. and Henshaw, E.C. (1988) The effect of Mg²⁺ and guanine nucleotide exchange factor on the binding of guanine nucleotides to eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem*, 263, 5519-5525.
- Panning, B. and Smiley, J.R. (1993) Activation of RNA polymerase III transcription of human Alu repetitive elements by adenovirus type 5: requirement for the E1b 58-kilodalton protein and the products of E4 open reading frames 3 and 6. *Mol Cell Biol*, 13, 3231-3244.
- Park, J.A., Ahn, J.W., Kim, Y.K., Kim, S.J., Kim, J.K., Kim, W.T. and Pai, H.S. (2005) Retinoblastoma protein regulates cell proliferation, differentiation, and endoreduplication in plants. *Plant J*, 42, 153-163.
- Parthun, M.R., Widom, J. and Gottschling, D.E. (1996) The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell*, 87, 85-94.
- Paschen, W. (2003) Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium*, 34, 365-383.
- Pascual-Ahuir, A., Serrano, R. and Proft, M. (2001) The Sko1p repressor and Gcn4p activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 21, 16-25.
- Pathak, V.K., Nielsen, P.J., Trachsel, H. and Hershey, J.W. (1988) Structure of the beta subunit of translational initiation factor eIF-2. *Cell*, 54, 633-639.
- Paulson, K.E. and Schmid, C.W. (1986) Transcriptional inactivity of Alu repeats in HeLa cells. *Nucleic Acids Res*, 14, 6145-6158.
- Pearson, B.E., Nasheuer, H.P. and Wang, T.S. (1991) Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol Cell Biol*, 11, 2081-2095.
- Pelissier, T., Bousquet-Antonelli, C., Lavie, L. and Deragon, J.M. (2004) Synthesis and processing of tRNA-related SINE transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*, 32, 3957-3966.
- Pereira, S.A. and Livi, G.P. (1995) A GCN-like response in *Candida albicans*. *Cell Biol Int*, 19, 65-69.
- Pines, J. and Hunter, T. (1990) Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature*, 346, 760-763.
- Podust, L.M., Krezel, A.M. and Kim, Y. (2001) Crystal structure of the CCAAT box/enhancer-binding protein beta activating transcription factor-4 basic leucine zipper heterodimer in the absence of DNA. *J Biol Chem*, 276, 505-513.
- Pomar, N., Berlanga, J.J., Campuzano, S., Hernandez, G., Elias, M. and de Haro, C. (2003) Functional characterization of *Drosophila melanogaster* PERK eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) kinase. *Eur J Biochem*, 270, 293-306.
- Pouch-Pelissier, M.N., Pelissier, T., Elmayan, T., Vaucheret, H., Boko, D., Jantsch, M.F. and Deragon, J.M. (2008) SINE RNA induces severe developmental defects in *Arabidopsis thaliana* and interacts with HYL1 (DRB1), a key member of the DCL1 complex. *PLoS Genet*, 4, e1000096.
- Prak, E.T. and Kazazian, H.H., Jr. (2000) Mobile elements and the human genome. *Nat Rev Genet*, 1, 134-144.
- Proud, C.G. (1995) PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem Sci*, 20, 241-246.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, 24, 218-229.

- Qian, Y.W., Wang, Y.C., Hollingsworth, R.E., Jr., Jones, D., Ling, N. and Lee, E.Y. (1993) A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast. *Nature*, 364, 648-652.
- Qin, X.Q., Chittenden, T., Livingston, D.M. and Kaelin, W.G., Jr. (1992) Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev*, 6, 953-964.
- Qiu, H., Dong, J., Hu, C., Francklyn, C.S. and Hinnebusch, A.G. (2001) The tRNA-binding moiety in GCN2 contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for tRNA binding and kinase activation. *EMBO J*, 20, 1425-1438.
- Qiu, H., Garcia-Barrio, M.T. and Hinnebusch, A.G. (1998) Dimerization by translation initiation factor 2 kinase GCN2 is mediated by interactions in the C-terminal ribosome-binding region and the protein kinase domain. *Mol Cell Biol*, 18, 2697-2711.
- Qiu, H., Hu, C., Dong, J. and Hinnebusch, A.G. (2002) Mutations that bypass tRNA binding activate the intrinsically defective kinase domain in GCN2. *Genes Dev*, 16, 1271-1280.
- Rafie-Kolpin, M., Chefalo, P.J., Hussain, Z., Hahn, J., Uma, S., Matts, R.L. and Chen, J.J. (2000) Two heme-binding domains of heme-regulated eukaryotic initiation factor-2 α kinase. N terminus and kinase insertion. *J Biol Chem*, 275, 5171-5178.
- Rafie-Kolpin, M., Han, A.P. and Chen, J.J. (2003) Autophosphorylation of threonine 485 in the activation loop is essential for attaining eIF2 α kinase activity of HRI. *Biochemistry*, 42, 6536-6544.
- Ramirez-Parra, E., Frundt, C. and Gutierrez, C. (2003) A genome-wide identification of E2F-regulated genes in Arabidopsis. *Plant J*, 33, 801-811.
- Ramirez-Parra, E., Lopez-Matas, M.A., Frundt, C. and Gutierrez, C. (2004) Role of an atypical E2F transcription factor in the control of Arabidopsis cell growth and differentiation. *Plant Cell*, 16, 2350-2363.
- Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M.B. and Gutierrez, C. (1999) The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Res*, 27, 3527-3533.
- Ramirez, M., Wek, R.C. and Hinnebusch, A.G. (1991) Ribosome association of GCN2 protein kinase, a translational activator of the GCN4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 11, 3027-3036.
- Ramirez, M., Wek, R.C., Vazquez de Aldana, C.R., Jackson, B.M., Freeman, B. and Hinnebusch, A.G. (1992) Mutations activating the yeast eIF-2 α kinase GCN2: isolation of alleles altering the domain related to histidyl-tRNA synthetases. *Mol Cell Biol*, 12, 5801-5815.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A. and Dynlacht, B.D. (2002) E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev*, 16, 245-256.
- Riley, D.J., Liu, C.Y. and Lee, W.H. (1997) Mutations of N-terminal regions render the retinoblastoma protein insufficient for functions in development and tumor suppression. *Mol Cell Biol*, 17, 7342-7352.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqumard, A. and Murray, J.A. (1999) Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science*, 283, 1541-1544.
- Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L. and Wolffe, A.P. (2000) DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*, 25, 338-342.

- Rohila, J.S., Chen, M., Cerny, R. and Fromm, M.E. (2004) Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J*, 38, 172-181.
- Rolfes, R.J. and Hinnebusch, A.G. (1993) Translation of the yeast transcriptional activator GCN4 is stimulated by purine limitation: implications for activation of the protein kinase GCN2. *Mol Cell Biol*, 13, 5099-5111.
- Rook, F., Gerrits, N., Kortstee, A., van Kampen, M., Borrias, M., Weisbeek, P. and Smeeckens, S. (1998) Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J*, 15, 253-263.
- Rosenberg, M. and Paterson, B.M. (1979) Efficient cap-dependent translation of polycistronic prokaryotic mRNAs is restricted to the first gene in the operon. *Nature*, 279, 696-701.
- Roudier, F., Fedorova, E., Gyorgyey, J., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, A. and Kondorosi, E. (2000) Cell cycle function of a Medicago sativa A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein. *Plant J*, 23, 73-83.
- Roussou, I., Thireos, G. and Hauge, B.M. (1988) Transcriptional-translational regulatory circuit in Saccharomyces cerevisiae which involves the GCN4 transcriptional activator and the GCN2 protein kinase. *Mol Cell Biol*, 8, 2132-2139.
- Rowlands, A.G., Panniers, R. and Henshaw, E.C. (1988) The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem*, 263, 5526-5533.
- Rubin, C.M., Kimura, R.H. and Schmid, C.W. (2002) Selective stimulation of translational expression by Alu RNA. *Nucleic Acids Res*, 30, 3253-3261.
- Rubin, E., Mitnacht, S., Villa-Moruzzi, E. and Ludlow, J.W. (2001) Site-specific and temporally-regulated retinoblastoma protein dephosphorylation by protein phosphatase type 1. *Oncogene*, 20, 3776-3785.
- Rudin, C.M. and Thompson, C.B. (2001) Transcriptional activation of short interspersed elements by DNA-damaging agents. *Genes Chromosomes Cancer*, 30, 64-71.
- Ruff, M., Krishnaswamy, S., Boeglin, M., Poterszman, A., Mitschler, A., Podjarny, A., Rees, B., Thierry, J.C. and Moras, D. (1991) Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp). *Science*, 252, 1682-1689.
- Rugner, A., Frohnemeyer, H., Nake, C., Wellmer, F., Kircher, S., Schafer, E. and Harter, K. (2001) Isolation and characterization of four novel parsley proteins that interact with the transcriptional regulators CPRF1 and CPRF2. *Mol Genet Genomics*, 265, 964-976.
- Sabelli, P.A. and Larkins, B.A. (2006) Grasses like mammals? Redundancy and compensatory regulation within the retinoblastoma protein family. *Cell Cycle*, 5, 352-355.
- Safrany, J., Haasz, V., Mate, Z., Ciolfi, A., Feher, B., Oravecz, A., Stec, A., Dallmann, G., Morelli, G., Ulm, R. and Nagy, F. (2008) Identification of a novel cis-regulatory element for UV-B-induced transcription in Arabidopsis. *Plant J*, 54, 402-414.
- Sage, J., Mulligan, G.J., Attardi, L.D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E. and Jacks, T. (2000) Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev*, 14, 3037-3050.
- Saier, M.H., Jr. (2000) Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. *Microbiology*, 146 (Pt 8), 1775-1795.
- Santoyo, J., Alcalde, J., Mendez, R., Pulido, D. and de Haro, C. (1997) Cloning and characterization of a cDNA encoding a protein synthesis initiation factor-2alpha (eIF-

- 2alpha) kinase from *Drosophila melanogaster*. Homology To yeast GCN2 protein kinase. *J Biol Chem*, 272, 12544-12550.
- Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004) A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 45, 309-317.
- Sattlegger, E. and Hinnebusch, A.G. (2000) Separate domains in GCN1 for binding protein kinase GCN2 and ribosomes are required for GCN2 activation in amino acid-starved cells. *EMBO J*, 19, 6622-6633.
- Sattlegger, E. and Hinnebusch, A.G. (2005) Polyribosome binding by GCN1 is required for full activation of eukaryotic translation initiation factor 2{alpha} kinase GCN2 during amino acid starvation. *J Biol Chem*, 280, 16514-16521.
- Sattlegger, E., Hinnebusch, A.G. and Barthelmess, I.B. (1998) cpc-3, the *Neurospora crassa* homologue of yeast GCN2, encodes a polypeptide with juxtaposed eIF2alpha kinase and histidyl-tRNA synthetase-related domains required for general amino acid control. *J Biol Chem*, 273, 20404-20416.
- Schalm, S.S. and Blenis, J. (2002) Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr Biol*, 12, 632-639.
- Schalm, S.S., Fingar, D.C., Sabatini, D.M. and Blenis, J. (2003) TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr Biol*, 13, 797-806.
- Schmid, C.W. (1998) Does SINE evolution preclude Alu function? *Nucleic Acids Res*, 26, 4541-4550.
- Schnittger, A., Schobinger, U., Bouyer, D., Weinl, C., Stierhof, Y.D. and Hulskamp, M. (2002a) Ectopic D-type cyclin expression induces not only DNA replication but also cell division in *Arabidopsis* trichomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 6410-6415.
- Schnittger, A., Schobinger, U., Stierhof, Y.D. and Hulskamp, M. (2002b) Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating *Arabidopsis* trichomes. *Curr Biol*, 12, 415-420.
- Schramm, L. and Hernandez, N. (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev*, 16, 2593-2620.
- Schroder, M. and Kaufman, R.J. (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*, 569, 29-63.
- Schroeder, J.I. and Nambara, E. (2006) A quick release mechanism for abscisic acid. *Cell*, 126, 1023-1025.
- Schwartz, L.B., Sklar, V.E., Jaehning, J.A., Weinmann, R. and Roeder, R.G. (1974) Isolation and partial characterization of the multiple forms of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase in the mouse myeloma, MOPC 315. *J Biol Chem*, 249, 5889-5897.
- Schwarz, J.K., Devoto, S.H., Smith, E.J., Chellappan, S.P., Jakoi, L. and Nevins, J.R. (1993) Interactions of the p107 and Rb proteins with E2F during the cell proliferation response. *Embo J*, 12, 1013-1020.
- Scott, P.H., Cairns, C.A., Sutcliffe, J.E., Alzuherri, H.M., McLees, A., Winter, A.G. and White, R.J. (2001) Regulation of RNA polymerase III transcription during cell cycle entry. *J Biol Chem*, 276, 1005-1014.
- Sekine, M., Ito, M., Uemukai, K., Maeda, Y., Nakagami, H. and Shinmyo, A. (1999) Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett*, 460, 117-122.
- Shah, J. (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol*, 6, 365-371.

- Shaikhin, S.M., Smailov, S.K., Lee, A.V., Kozhanov, E.V. and Iskakov, B.K. (1992) Interaction of wheat germ translation initiation factor 2 with GDP and GTP. *Biochimie*, 74, 447-454.
- Shenton, D., Smirnova, J.B., Selley, J.N., Carroll, K., Hubbard, S.J., Pavitt, G.D., Ashe, M.P. and Grant, C.M. (2006) Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *J Biol Chem*, 281, 29011-29021.
- Sherr, C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science*, 274, 1672-1677.
- Shi, Y., Vattem, K.M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L. and Wek, R.C. (1998) Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol*, 18, 7499-7509.
- Shimizu, H., Sato, K., Berberich, T., Miyazaki, A., Ozaki, R., Imai, R. and Kusano, T. (2005) LIP19, a basic region leucine zipper protein, is a Fos-like molecular switch in the cold signaling of rice plants. *Plant Cell Physiol*, 46, 1623-1634.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol*, 7, 161-167.
- Shirodkar, S., Ewen, M., DeCaprio, J.A., Morgan, J., Livingston, D.M. and Chittenden, T. (1992) The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell*, 68, 157-166.
- Simmen, M.W. and Bird, A. (2000) Sequence analysis of transposable elements in the sea squirt, *Ciona intestinalis*. *Mol Biol Evol*, 17, 1685-1694.
- Singh, K., Carey, M., Saragosti, S. and Botchan, M. (1985) Expression of enhanced levels of small RNA polymerase III transcripts encoded by the B2 repeats in simian virus 40-transformed mouse cells. *Nature*, 314, 553-556.
- Sinnett, D., Richer, C., Deragon, J.M. and Labuda, D. (1991) Alu RNA secondary structure consists of two independent 7 SL RNA-like folding units. *J Biol Chem*, 266, 8675-8678.
- Siu, F., Bain, P.J., LeBlanc-Chaffin, R., Chen, H. and Kilberg, M.S. (2002) ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem*, 277, 24120-24127.
- Slebos, R.J., Resnick, M.A. and Taylor, J.A. (1998) Inactivation of the p53 tumor suppressor gene via a novel Alu rearrangement. *Cancer Res*, 58, 5333-5336.
- Smith, D.W. (1969) The effect of salt solutions on the acceptance of amino acids by transfer ribonucleic acid. *J Biol Chem*, 244, 896-901.
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H. and Murray, J.A. (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell*, 7, 85-103.
- Sood, R., Porter, A.C., Ma, K., Quilliam, L.A. and Wek, R.C. (2000) Pancreatic eukaryotic initiation factor-2alpha kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem J*, 346 Pt 2, 281-293.
- Sormani, R., Yao, L., Menand, B., Ennar, N., Lecampion, C., Meyer, C. and Robaglia, C. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol*, 7, 26.
- Sozzani, R., Maggio, C., Varotto, S., Canova, S., Bergounioux, C., Albani, D. and Cella, R. (2006) Interplay between *Arabidopsis* activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development. *Plant Physiol*, 140, 1355-1366.
- St Johnston, D., Brown, N.H., Gall, J.G. and Jantsch, M. (1992) A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10979-10983.

- Stadtman, E.R. and Levine, R.L. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25, 207-218.
- Sterner, J.M., Dew-Knight, S., Musahl, C., Kornbluth, S. and Horowitz, J.M. (1998) Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7. *Mol Cell Biol*, 18, 2748-2757.
- Steward, F.C., Mapes, M.O., Kent, A.E. and Holsten, R.D. (1964) Growth and Development of Cultured Plant Cells. *Science*, 143, 20-27.
- Stubdal, H., Zalvide, J., Campbell, K.S., Schweitzer, C., Roberts, T.M. and DeCaprio, J.A. (1997) Inactivation of pRB-related proteins p130 and p107 mediated by the J domain of simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol*, 17, 4979-4990.
- Stubdal, H., Zalvide, J. and DeCaprio, J.A. (1996) Simian virus 40 large T antigen alters the phosphorylation state of the RB-related proteins p130 and p107. *J Virol*, 70, 2781-2788.
- Su, Q., Wang, S., Gao, H.Q., Kazemi, S., Harding, H.P., Ron, D. and Koromilas, A.E. (2008) Modulation of the eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase PERK by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 283, 469-475.
- Sutcliffe, J.E., Brown, T.R., Allison, S.J., Scott, P.H. and White, R.J. (2000) Retinoblastoma protein disrupts interactions required for RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol*, 20, 9192-9202.
- Sutcliffe, J.E., Cairns, C.A., McLees, A., Allison, S.J., Tosh, K. and White, R.J. (1999) RNA polymerase III transcription factor IIIB is a target for repression by pocket proteins p107 and p130. *Mol Cell Biol*, 19, 4255-4261.
- Takahashi, Y., Rayman, J.B. and Dynlacht, B.D. (2000) Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev*, 14, 804-816.
- Tan, S.L., Gale, M.J., Jr. and Katze, M.G. (1998) Double-stranded RNA-independent dimerization of interferon-induced protein kinase PKR and inhibition of dimerization by the cellular P58IPK inhibitor. *Mol Cell Biol*, 18, 2431-2443.
- Tan, X. and Wang, J.Y. (1998) The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell Biol*, 8, 116-120.
- Tatout, C., Lavie, L. and Deragon, J.M. (1998) Similar target site selection occurs in integration of plant and mammalian retrotransposons. *J Mol Evol*, 47, 463-470.
- Tatout, C., Warwick, S., Lenoir, A. and Deragon, J.M. (1999) SINE Insertions as Clade Markers for Wild Crucifer Species *Molecular biology and evolution*, 16, 1614-1621.
- Tedesco, D., Lukas, J. and Reed, S.I. (2002) The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev*, 16, 2946-2957.
- Tee, A.R. and Blenis, J. (2005) mTOR, translational control and human disease. *Semin Cell Dev Biol*, 16, 29-37.
- Thalmeier, K., Synovzik, H., Mertz, R., Winnacker, E.L. and Lipp, M. (1989) Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev*, 3, 527-536.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796-815.
- Thireos, G., Penn, M.D. and Greer, H. (1984) 5' untranslated sequences are required for the translational control of a yeast regulatory gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 5096-5100.

- Timchenko, T., Katul, L., Aronson, M., Vega-Arreguin, J.C., Ramirez, B.C., Vetten, H.J. and Gronenborn, B. (2006) Infectivity of nanovirus DNAs: induction of disease by cloned genome components of Faba bean necrotic yellows virus. *J Gen Virol*, 87, 1735-1743.
- Ting, N.S., Kao, P.N., Chan, D.W., Lintott, L.G. and Lees-Miller, S.P. (1998) DNA-dependent protein kinase interacts with antigen receptor response element binding proteins NF90 and NF45. *J Biol Chem*, 273, 2136-2145.
- Torres-Larios, A., Sankaranarayanan, R., Rees, B., Dock-Bregeon, A.C. and Moras, D. (2003) Conformational movements and cooperativity upon amino acid, ATP and tRNA binding in threonyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol*, 331, 201-211.
- Trentin, J.J., Yabe, Y. and Taylor, G. (1962) The quest for human cancer viruses. *Science*, 137, 835-841.
- Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Wen, J. and Lees, J.A. (2001) The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1519-1524.
- Tsai, L.H., Harlow, E. and Meyerson, M. (1991) Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature*, 353, 174-177.
- Tvegard, T., Soltani, H., Skjolberg, H.C., Krohn, M., Nilssen, E.A., Kearsey, S.E., Grallert, B. and Boye, E. (2007) A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition. *Genes Dev*, 21, 649-654.
- Ullu, E. and Tschudi, C. (1984) Alu sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature*, 312, 171-172.
- Umen, J.G. and Goodenough, U.W. (2001) Control of cell division by a retinoblastoma protein homolog in Chlamydomonas. *Genes Dev*, 15, 1652-1661.
- Vairo, G., Livingston, D.M. and Ginsberg, D. (1995) Functional interaction between E2F-4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes Dev*, 9, 869-881.
- Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S. and Trouche, D. (2001) Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol Cell Biol*, 21, 6484-6494.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S. and Inze, D. (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 14, 903-916.
- Vandepoele, K., Vlieghe, K., Florquin, K., Hennig, L., Beemster, G.T., Gruissem, W., Van de Peer, Y., Inze, D. and De Veylder, L. (2005) Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol*, 139, 316-328.
- Vattem, K.M. and Wek, R.C. (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11269-11274.
- Vazquez de Aldana, C.R., Marton, M.J. and Hinnebusch, A.G. (1995) GCN20, a novel ATP binding cassette protein, and GCN1 reside in a complex that mediates activation of the eIF-2 alpha kinase GCN2 in amino acid-starved cells. *EMBO J*, 14, 3184-3199.
- Verkest, A., Manes, C.L., Vercruysse, S., Maes, S., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Genschik, P., Kuiper, M., Inze, D. and De Veylder, L. (2005) The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during Arabidopsis leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *Plant Cell*, 17, 1723-1736.

- Vincentz, M., Bandeira-Kobarg, C., Gauer, L., Schlogl, P. and Leite, A. (2003) Evolutionary pattern of angiosperm bZIP factors homologous to the maize Opaque2 regulatory protein. *J Mol Evol*, 56, 105-116.
- Vinson, C.R., Hai, T. and Boyd, S.M. (1993) Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: prediction and rational design. *Genes Dev*, 7, 1047-1058.
- Wagner, D. and Meyerowitz, E.M. (2002) SPLAYED, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in Arabidopsis. *Curr Biol*, 12, 85-94.
- Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J. and Munoz, N. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189, 12-19.
- Wallace, M. and Ball, K.L. (2004) Docking-dependent regulation of the Rb tumor suppressor protein by Cdk4. *Mol Cell Biol*, 24, 5606-5619.
- Wang, H.G., Draetta, G. and Moran, E. (1991) E1A induces phosphorylation of the retinoblastoma protein independently of direct physical association between the E1A and retinoblastoma products. *Mol Cell Biol*, 11, 4253-4265.
- Wang, K.L., Li, H. and Ecker, J.R. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 14 Suppl, S131-151.
- Wang, Y., Magnard, J.L., McCormick, S. and Yang, M. (2004) Progression through meiosis I and meiosis II in Arabidopsis anthers is regulated by an A-type cyclin predominately expressed in prophase I. *Plant Physiol*, 136, 4127-4135.
- Wanke, C., Eckert, S., Albrecht, G., van Hartingsveldt, W., Punt, P.J., van den Hondel, C.A. and Braus, G.H. (1997) The *Aspergillus niger* GCN4 homologue, *cpcA*, is transcriptionally regulated and encodes an unusual leucine zipper. *Mol Microbiol*, 23, 23-33.
- Waxman, H.S. and Rabinovitz, M. (1965) Iron Supplementation in Vitro and the State of Aggregation and Function of Reticulocyte Ribosomes in Hemoglobin Synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 19, 538-545.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81, 323-330.
- Wek, R.C., Jackson, B.M. and Hinnebusch, A.G. (1989) Juxtaposition of domains homologous to protein kinases and histidyl-tRNA synthetases in GCN2 protein suggests a mechanism for coupling GCN4 expression to amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 4579-4583.
- Wek, R.C., Ramirez, M., Jackson, B.M. and Hinnebusch, A.G. (1990) Identification of positive-acting domains in GCN2 protein kinase required for translational activation of GCN4 expression. *Mol Cell Biol*, 10, 2820-2831.
- Wek, S.A., Zhu, S. and Wek, R.C. (1995) The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol Cell Biol*, 15, 4497-4506.
- Welch, P.J. and Wang, J.Y. (1993) A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell*, 75, 779-790.
- Weltmeier, F., Ehlert, A., Mayer, C.S., Dietrich, K., Wang, X., Schutze, K., Alonso, R., Harter, K., Vicente-Carbajosa, J. and Droge-Laser, W. (2006) Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO J*, 25, 3133-3143.

- White, R.J., Gottlieb, T.M., Downes, C.S. and Jackson, S.P. (1995) Cell cycle regulation of RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol*, 15, 6653-6662.
- White, R.J., Trouche, D., Martin, K., Jackson, S.P. and Kouzarides, T. (1996) Repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma protein. *Nature*, 382, 88-90.
- Whyte, P., Buchkovich, K.J., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Raybuck, M., Weinberg, R.A. and Harlow, E. (1988) Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 334, 124-129.
- Whyte, P., Williamson, N.M. and Harlow, E. (1989) Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell*, 56, 67-75.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P. and Schulman, A.H. (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet*, 8, 973-982.
- Wiese, A., Elzinga, N., Wobbes, B. and Smeekeens, S. (2004) A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. *Plant Cell*, 16, 1717-1729.
- Wiese, A., Elzinga, N., Wobbes, B. and Smeekeens, S. (2005) Sucrose-induced translational repression of plant bZIP-type transcription factors. *Biochem Soc Trans*, 33, 272-275.
- Williams, L. and Grafi, G. (2000) The retinoblastoma protein - a bridge to heterochromatin. *Trends Plant Sci*, 5, 239-240.
- Williams, W.P., Tamburic, L. and Astell, C.R. (2004) Increased levels of B1 and B2 SINE transcripts in mouse fibroblast cells due to minute virus of mice infection. *Virology*, 327, 233-241.
- Wu, C.L., Zukerberg, L.R., Ngwu, C., Harlow, E. and Lees, J.A. (1995) In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol Cell Biol*, 15, 2536-2546.
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F.A., Field, S.J., Greenberg, M.E., Orkin, S., Nevins, J.R., Robinson, M.L. and Leone, G. (2001) The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature*, 414, 457-462.
- Wu, S. and Kaufman, R.J. (1997) A model for the double-stranded RNA (dsRNA)-dependent dimerization and activation of the dsRNA-activated protein kinase PKR. *J Biol Chem*, 272, 1291-1296.
- Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124, 471-484.
- Xiao, Z.X., Chen, J., Levine, A.J., Modjtahedi, N., Xing, J., Sellers, W.R. and Livingston, D.M. (1995) Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature*, 375, 694-698.
- Xiao, Z.X., Ginsberg, D., Ewen, M. and Livingston, D.M. (1996) Regulation of the retinoblastoma protein-related protein p107 by G1 cyclin-associated kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4633-4637.
- Xie, Q., Suarez-Lopez, P. and Gutierrez, C. (1995) Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO J*, 14, 4073-4082.
- Xiong, L., Schumaker, K.S. and Zhu, J.K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 14 Suppl, S165-183.

- Xu, H.J., Xu, K., Zhou, Y., Li, J., Benedict, W.F. and Hu, S.X. (1994) Enhanced tumor cell growth suppression by an N-terminal truncated retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9837-9841.
- Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E. and Dyson, N.J. (1996) Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell*, 85, 537-548.
- Yan, Z., DeGregori, J., Shohet, R., Leone, G., Stillman, B., Nevins, J.R. and Williams, R.S. (1998) Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3603-3608.
- Yang, H., Williams, B.O., Hinds, P.W., Shih, T.S., Jacks, T., Bronson, R.T. and Livingston, D.M. (2002) Tumor suppression by a severely truncated species of retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, 22, 3103-3110.
- Yang, R., Wek, S.A. and Wek, R.C. (2000) Glucose limitation induces GCN4 translation by activation of Gcn2 protein kinase. *Mol Cell Biol*, 20, 2706-2717.
- Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H.C., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T.M., Hanauer, A. and Karsenty, G. (2004) ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell*, 117, 387-398.
- Yu, Y., Steinmetz, A., Meyer, D., Brown, S. and Shen, W.H. (2003) The tobacco A-type cyclin, Nicta;CYCA3;2, at the nexus of cell division and differentiation. *Plant Cell*, 15, 2763-2777.
- Zamanian, M. and La Thangue, N.B. (1993) Transcriptional repression by the Rb-related protein p107. *Mol Biol Cell*, 4, 389-396.
- Zhan, K., Narasimhan, J. and Wek, R.C. (2004) Differential activation of eIF2 kinases in response to cellular stresses in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 168, 1867-1875.
- Zhan, K., Vattem, K.M., Bauer, B.N., Dever, T.E., Chen, J.J. and Wek, R.C. (2002) Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 by heme-regulated inhibitor kinase-related protein kinases in *Schizosaccharomyces pombe* is important for resistance to environmental stresses. *Mol Cell Biol*, 22, 7134-7146.
- Zhang, Y. and Chellappan, S.P. (1995) Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerization partner of E2F. *Oncogene*, 10, 2085-2093.
- Zhang, Y., Dickinson, J.R., Paul, M.J. and Halford, N.G. (2003) Molecular cloning of an Arabidopsis homologue of GCN2, a protein kinase involved in co-ordinated response to amino acid starvation. *Planta*, 217, 668-675.
- Zhao, J. and Last, R.L. (1996) Coordinate regulation of the tryptophan biosynthetic pathway and indolic phytoalexin accumulation in Arabidopsis. *Plant Cell*, 8, 2235-2244.
- Zhao, J., Williams, C.C. and Last, R.L. (1998) Induction of Arabidopsis tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor. *Plant Cell*, 10, 359-370.
- Zhao, L. and Chang, L.S. (1997) The human POLD1 gene. Identification of an upstream activator sequence, activation by Sp1 and Sp3, and cell cycle regulation. *J Biol Chem*, 272, 4869-4882.
- Zheng, S.J., van Dijk, J.P., Bruinsma, M. and Dicke, M. (2007) Sensitivity and speed of induced defense of cabbage (*Brassica oleracea* L.): dynamics of BoLOX expression patterns during insect and pathogen attack. *Mol Plant Microbe Interact*, 20, 1332-1345.

- Zhu, L., van den Heuvel, S., Helin, K., Fattaey, A., Ewen, M., Livingston, D., Dyson, N. and Harlow, E. (1993) Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev*, 7, 1111-1125.
- Zhu, S., Sobolev, A.Y. and Wek, R.C. (1996) Histidyl-tRNA synthetase-related sequences in GCN2 protein kinase regulate in vitro phosphorylation of eIF-2. *J Biol Chem*, 271, 24989-24994.
- Zhu, S. and Wek, R.C. (1998) Ribosome-binding domain of eukaryotic initiation factor-2 kinase GCN2 facilitates translation control. *J Biol Chem*, 273, 1808-1814.
- Zilberman, D., Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 299, 716-719.
- Zimmermann, S., Baumann, A., Jaekel, K., Marbach, I., Engelberg, D. and Frohnmeier, H. (1999) UV-responsive genes of arabidopsis revealed by similarity to the Gcn4-mediated UV response in yeast. *J Biol Chem*, 274, 17017-17024.
- zur Hausen, H. (1996) Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, 1288, F55-78.

Annexes

Annexe 1 : Solution Stock-extraction ADN.

Tampon d'extraction d'ADN génomique.

Solution stock 2X :

5M NaCl	12 ml
1M Tris pH 7.5	10 mL
0.5M EDTA	8 mL
4g sarkosyl	
20% SDS	5 mL
H ₂ O	q.s.p. 100 mL

Tampon d'extraction :

Solution stock 2X	25 mL
12M Urée	10 mL
Phénol	2.5 mL
H ₂ O	2.5mL

Tampon TE 10X (Tris EDTA)

Tris-HCl pH 7.4	100mM
EDTA pH8.0	10mM

Stériliser à l'autoclave.

Annexe 2 : Solution Stock-extraction ADN.

Tampon Guanidine

Hydrochloride de Guanidine	8 M
MES (N-morpholino ethane sulfonic acid)	20 mM
EDTA	20 mM

Ajuster le pH à 7.0 avec HCl

Ajouter du β -Mercaptoéthanol à 50mM final avant utilisation.

Tampon de charge ARN gel MOPS-agarose

<u>Tampon de charge glycérol</u>		<u>Tampon de charge ARN</u>	
Glycérol	5 mL	Formamide	500 μ L
EDTA 0.5M	20 μ L	Formaldéhyde 37%	175 μ L
Xylène Cyanol 2.5%	1 mL	Tampon MOPS 10X	100 μ L
Bleu de Bromophénol 2.5%	1 mL	Tampon de charge glycérol	220 μ L
H ₂ O	2.98 mL	Bromure d'éthidium (10mg/mL)	5 μ L

Gel MOPS-Agarose (300mL)

Agarose	3 g
MOPS10X	30 mL
H ₂ O	254.8 mL

Faire fondre le gel, laisser refroidir au bain marie à 55°C, puis ajouter 15.24 mL de Formaldéhyde et couler le gel.

Tampon d'hybridation ARN

SSC 20X	125 mL
Formamide	250 mL
SDS 20%	50 mL
Denhardt's 50X	5 mL
Sperme de saumon (12.5 mg/mL)	5 mL

Tampon SSC 20X

NaCl	179.3g
Citrate de Sodium	88.2g
H ₂ O	qsp 1 L
Ajuster le pH à 7.0 avec HCl	
Stériliser à l'autoclave.	

Gel 7% Acryl/Bis-Acrylamide (19/1)

Acryl 40%	17.5 mL
Urée	50 g
TBE 10X	10 mL
H ₂ O	qsp 100 mL
Polymérisation du gel par ajout de :	
APS 10%	1mL
TEMED	80 µL

Tampon MOPS 10X

MOPS	200 mM
Acétate de Sodium	50 mM
EDTA	10 mM
Ajuster le pH à 7.0 avec NaOH et filtrer sur membrane 0.22 µm.	

Tampon TBE 10X

Tris-Base	108g
Acide Borique	55g
EDTA	7.5g
H ₂ O	qsp 10 mL
Stériliser à l'autoclave.	

Tampon de charge gel PAA

Formamide 100%	9.8 mL
EDTA 0.5M, pH 8.0	40 µL
Xylène Cyanol 2.5%	0.1 mL
Bleu de Bromophénol 2.5%	0.1 mL
H ₂ O	qsp 10 mL

Annexe 3: Solution transformation plantes.

2YT

Tryptone	16 g
Yeast Extract	10g
NaCl	5 g
H ₂ O qsp 1 litre	
Ajuster le pH à 7 avec NaOH	
Autoclaver	

Milieu d'infiltration (100 mL)

Sucrose	5g
MgCl ₂ 1M	10 ml
H ₂ O q.s.p. 100 mL	
Juste avant d'infiltrer les plantes, ajouter 50 µl de Silwet.	

Annexe 4: Solution purification TAP tag.

(D'après Rohila *et al.*, 2004)

Tampon avec inhibiteur

	(Final)
Tris pH 8	20 mM
NaCl	150 mM
IGEPAL	0.1%
EDTA	2.5 mM
DTT	1 mM
Benzamidine	2 mM
PMSF	1 mM
Leupeptine	10 µM
DCI	10 µM
Glycérol	1 %
Cocktail inhibiteur	1 %
Sigma	

Tampon avec inhibiteur

	(Final)
Tris pH 8	20 mM
NaCl	150 mM
IGEPAL	0.1%
EDTA	2.5 mM
DTT	1 mM

Tampon TEV

	(Final)
Tampon TEV	1X
DTT	1 mM
E64	1 mM

Tampon CAM

	(Final)
DTT	1 mM
Tris pH 8	10 mM
NaCl	150 mM
Acétate de Mg ²⁺	1 mM
Imidazole	1 mM
CaCl ₂	2 mM
IGEPAL	0.1%

Tampon d'élution CAM

	(Final)
DTT	1 mM
Tris pH 8	10 mM
NaCl	150 mM
Acétate de Mg ²⁺	1 mM
Imidazole	1 mM
EGTA	2 mM
IGEPAL	0.1%

Annexe 5: Liste des amorces utilisées pour cette étude.

Tableau 1 : liste des amorces utilisées pour la détection de l'ADN viral.

Nom de l'amorce	Séquence
Rep2 DT	tcggcaagttatatgctgg
Rep2 Rev	agcaagggatcacatgacg
Rep2 Int Rev	actcccatggaccttcaag
CLINK DT	aaagtcgacccatctccttc
CLINK Rev	acttgaaacttgatattagcag
CLINK Int Rev	atgggtctgaaatatttctctc

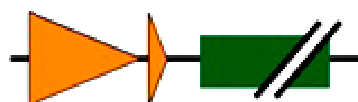
Tableau 2 : liste des amorces utilisées pour la fabrication des sondes utilisées dans les Northern blot.

Nom de l'amorce	Séquence	Gène
G6P DT	gtctcattcacttgaaagaatc	AT3G49360
G6P Rev	gcgtagatgttttcagctgg	AT3G49360
ChS DT	cctcatctccaagaagattgtg	AT5G13930
ChS Rev	tgatgtcattcaagacccatag	AT5G13930
PP2A DT	gcgaagaatacgcagaatcc	AT1G13320
PP2A Rev	cagatagttggtatcaggacac	AT1G13320
BaaT DT	gctgttagggcaaaggagc	AT3G49360
BaaT Rev	gagaactctccatcaatctta	AT3G49360
ProDH DT	ctttgaattttatggcaaccc	AT3G30775
ProDH Rev	cgtccataagttagagctc	AT3G30775
HDH DT	caatcgccgactttagactc	AT5G63890
HDH Rev	catacgcaacatcaaacgcttc	AT5G63890

LOX DT	gtattgtagagagtccttgctg	AT3G45140
LOX Rev	ctcgactcgtacttctcatc	AT3G45140
ASA DT	cttctctatgaacgtagcg	AT5G05730
ASA Rev	gcctccttgactcttcgc	AT5G05730
ASB DT	gttttggggaagagtcgtag	AT1G24807
ASB Rev	ttctgcttccacttttcacaa	AT1G24807
PAT DT	gatttggtttaaggcgctttg	AT5G17990
PAT Rev	gtttgagatgtttatccaagaatc	AT5G17990
TSA DT	gatggaagagcaagtcagaag	AT3G54640
TSA Rev	gtggcttgagtcacagtaac	AT3G54640
GS DT	gttacaacaccaaactctct	AT5G35630
GS Rev	gggcttcagcctcaagagtt	AT5G35630

Tableau 3 : liste des amorces utilisées dans la détection de l'ARNt valine co-purifié avec GCN2 TAP tag.

Nom de l'amorce	Séquence
Valine DT	ggtttcgtggtgtagttgg
Valine Rev	cccgggttcgaaccggag



Résumé

Chez les mammifères, l'infection par l'adénovirus conduit à l'activation de la transcription de certains éléments SINE Alu. Il s'agit d'un mécanisme conservé car il est observé avec d'autres familles de virus. Adénovirus code pour une protéine, E1A qui est capable d'interagir avec la protéine Rétinoblastome (RB). Cette interaction provoque l'inactivation de RB ce qui provoque probablement l'activation transcriptionnelle des éléments Alu. Ainsi, chez les mammifères, certaines protéines virales agissent négativement sur RB ce qui a pour conséquence de déréguler le cycle cellulaire, la transcription pol III de manière générale et la transcription des éléments SINE en particulier. Chez les plantes, l'activation de la transcription des éléments SINE à la suite d'un stress comme l'infection virale reste à démontrer. Cependant, le virus FBNYV possède au sein de son génome une protéine, CLINK, qui est entre autre constituée d'un domaine de liaison à RB similaire à celui retrouvé chez E1A d'adénovirus. La première étape de ce travail de thèse a porté sur l'analyse de la protéine CLINK et plus particulièrement l'effet de cette protéine sur le cycle cellulaire, sur la transcription pol III en général et sur la transcription des SINE endogènes de plantes.

La seconde partie de cette étude porte sur la fonction des éléments SINE de plantes au sein de la cellule. Chez les mammifères, l'élément SINE Alu est capable de jouer un rôle dans la physiologie de la cellule en réponse à certains stress. En effet, la transcription de ces éléments est activée à la suite d'une infection par certaines familles de virus. Les transcrits ainsi produits sont alors capables d'interagir avec la protéine PKR, une kinase d'eIF2 α . Ainsi, les éléments SINE sont capables d'intervenir dans des processus clefs de la cellule comme le mécanisme de régulation de la traduction. La seule kinase d'eIF2 α identifiée chez les plantes est la protéine GCN2. Ainsi, nous avons choisi de caractériser la fonction de cette protéine chez *Arabidopsis*. Nous avons déterminé les mécanismes de régulation de la protéine en mettant en évidence certains inducteurs spécifiques aux plantes. Ce travail a permis de montrer l'importance de la protéine pour la plante et de découvrir des fonctions potentielles de la protéine dans des voies de stress typiques des végétaux. Enfin, l'impact des SINE de plantes sur l'activité de GCN2 a été analysé.

Abstract

In mammals cells, adenovirus infection induces transcription of individual Alu loci. This mechanism is well-conserved and observed with other virus families. Adenovirus encodes a protein, E1A, capable of interacting with the retinoblastoma protein (RB). This interaction inactivates RB which probably leads to the transcriptional inactivation of Alu elements. Thus, in mammals, viral proteins can negatively regulate Rb and cause cell cycle deregulation, general pol III transcription and particularly SINE transcription. In plants, SINE transcriptional activation following viral stress is still to demonstrate. However, the FBNYV virus genome encodes a protein, CLINK, which contains a RB binding domain also found in the adenovirus protein E1A. The first step of this work was to analyze the CLINK protein and more precisely the impact of this protein on cell cycle deregulation, on general pol III transcription and particularly on endogenous plant SINE transcription.

The second part of this study focuses on SINE elements functions within the cell. In mammals, SINE element Alu has been shown to modulate the cell physiology in response to stresses. Indeed, transcription of those elements is activated following some viral infections. Those transcripts are able to interact with the PKR protein, an eIF2 α kinase. Thus, SINE elements are capable to modulate cellular functions such as translation regulation. Only one eIF2 α kinase has been identified in plants: the GCN2 protein. Thus, we characterized the function of this protein in *Arabidopsis*. We shown mechanisms that regulate the protein function and also found some plant-specific inductors. This study has shown that GCN2 is important in plants and that this protein intervenes in some plant-specific stress pathway. Finally, SINE impact on GCN2 activity has been study in plants.

Mots-clés:

SINE, Rb, cycle cellulaire, GCN2, eIF2 alpha, régulation de la traduction, stress, *Arabidopsis thaliana*

